



**Liliana Catarina de Sá
Mendes de Melo**

**Perfil de suscetibilidade do *Mycobacterium
tuberculosis* no CHEDV**



**Liliana Catarina de Sá
Mendes de Melo**

**Perfil de suscetibilidade do *Mycobacterium
tuberculosis* no CHEDV**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Dr.^a Ana Cristina Rodrigues Silva, Diretora Clínica do Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, EPE, médica especialista em Patologia Clínica e Diretora do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, EPE e da Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Prof. Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho ao Ricardo e à Matilde, os amores da minha vida, pelo amor e apoio incondicional que sempre me deram.

O júri

Presidente

Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Arguente

Professor Doutor João Tiago de Sousa Pinto Guimarães
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Orientadoras

Dr.^a Ana Cristina Rodrigues Silva
Diretora Clínica do Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, EPE;
Médica especialista em Patologia Clínica e Assistente Hospitalar Graduado
com funções de Direção do Serviço de Patologia Clínica no Centro Hospitalar
de Entre o Douro e Vouga, EPE.

Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À minha Diretora de Serviço, orientadora e amiga Dr.^a Ana Cristina Silva, por sempre acreditar nas minhas capacidades e por me incentivar continuamente no meu crescimento enquanto pessoa e profissional de saúde, assim como pela sua presença nos momentos de maior desânimo. Muito obrigada por todo o seu empenho, dedicação e apoio na escolha do tema e execução desta tese, assim como por toda a ajuda na recolha e seleção de dados. Obrigada por todas as chamadas de atenção, toda a força, todas as indicações e todo o incentivo que me prestou durante todo este tempo. A sua ajuda e dedicação foram fundamentais para a conclusão deste estudo. A sua amizade e carinho, desde sempre demonstrados, são um pilar fundamental no percurso e evolução da minha carreira profissional, assim como no meu crescimento como ser humano.

À Professora Doutora Sónia Mendo, minha orientadora na Universidade, pelo acompanhamento, disponibilidade, incentivo e orientação demonstrados durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor António Carlos Matias Correia, por me ter recebido na apresentação do tema e pelo apoio prestado no início do mestrado.

À Dr.^a. Isabel Valente e à Dra. Rosário Braga do CHVNG/Espinho e à Dra. Anabela Silva do INSA, pela ajuda, empenho e disponibilidade demonstrada no apoio para a execução desta tese.

Aos Engenheiros Paulo Simões e João Sebastião, pelo auxílio prestado na recolha dos dados informatizados.

Aos meus pais, à minha irmã, aos meus sogros, ao meu cunhado e à minha família, por estarem sempre do meu lado, por me compreenderem, ouvirem, perceberem e apoiarem nos muitos momentos de desânimo. O vosso apoio é a base da segurança e empenho em tudo.

Aos meus colegas do hospital, pelo apoio, compreensão e incentivo demonstrados ao longo da concretização deste projecto de investigação.

A todos aqueles que, de alguma forma, tenham contribuído para que este projeto se tornasse realidade.

palavras-chave

Mycobacterium tuberculosis, tuberculose, resistência aos antibióticos, MDR-TB, XDR-TB

resumo

A tuberculose continua a revelar-se como uma das principais causas de morte em todo o mundo provocadas por um único agente infeccioso. A resistência aos antibióticos, e em particular a multirresistência, são o resultado de um controlo inadequado da doença, constituindo um problema grave e uma verdadeira ameaça aos programas de controlo da tuberculose.

O presente trabalho reporta sobre um estudo de perfil de suscetibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* aos antibióticos no CHEDV durante um período de 5 anos (1 julho de 2006 a 30 de junho de 2011). Os resultados obtidos foram estudados através de um programa estatístico que permitiu conhecer esses perfis nas estirpes identificadas em 131 pacientes, durante o período de estudo. Os demais objetivos do trabalho passavam pela verificação de possíveis alterações nos padrões de suscetibilidade, pela procura de eventuais relações entre as variáveis estudadas e os dados da DGS e da ARS Norte, e pela avaliação e interpretação dos resultados obtidos no sentido de conhecer possíveis alterações de suscetibilidade e padrões de resistências. Os antibióticos estudados, nomeadamente, rifampicina, isoniazida, estreptomicina, pirazinamida, etambutol, PAS, D-cicloserina, etionamida, ciprofloxacina, ofloxacina, canamicina, amicacina, capreomicina e linezolid foram escolhidos com base nos critérios da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). No presente estudo obteve-se uma prevalência de amostras positivas de 6% para MTC e 2% para MNT (189 amostras positivas das 2459 estudadas). Estas 189 amostras positivas representavam 132 pacientes com resultado positivo para MTC e 57 pacientes com identificações de MNT. Os TSA apenas foram realizados nas amostras de *Mycobacterium tuberculosis* (131 amostras), uma vez que uma das amostras obteve uma identificação de BCG, num contexto de BCGite, não tendo sido realizado o antibiograma. Das 131 amostras estudadas observou-se que os perfis de resistência e sensibilidade variaram ao longo dos 5 anos de estudo. Os perfis de suscetibilidade dos pacientes estudados demonstram que 84,6% das estirpes apresentam sensibilidade a todos os fármacos de 1ª linha, 1,5% apresentam resistência a todos os fármacos de 1ª linha, 0,8% apresentam resistência à INH, RIF e STR, 5,4% de resistência à STR e INH, 0,8% de resistência à PZA e 1,5% de resistência à INH.

As aprendizagens do passado dizem-nos que a solução do problema mundial da tuberculose não passa apenas por novas armas terapêuticas mais potentes e eficazes. A vitória contra esta temível doença requer, sobretudo, uma estratégia adequada a cada país e uma organização que a suporte, assim como uma luta eficaz à pobreza, à iliteracia e ao subdesenvolvimento. Uma vacina, idealmente, deveria ser significativamente eficaz para evitar a invasão nos tecidos pelo bacilo, proteger contra a tuberculose primária e secundária, contribuir para a destruição dos bacilos persistentes e evitar a reinfeção endógena.

keywords

Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis, antibiotic resistance, MDR-TB, XDR-TB

abstract

Tuberculosis persists as a major cause of death all over the world due to a single infectious agent. Antibiotic resistance, and particularly multiresistance, are the result of an inadequate control of the disease, and constitute a severe problem and a serious threat to tuberculosis control programs.

This work reports on a study of the susceptibility profile of *Mycobacterium tuberculosis* to antibiotics in CHEDV over a period of 5 years (July 1st 2006 to June 30th 2011). The results obtained were analyzed using statistics software, which allowed the discovery of those profiles on the strains identified in 131 patients during the study period. Other objectives of this work were the verification of potential variations on the susceptibility patterns, the search for potential relationships between this study's data and the data from DGS and ARS Norte studies, and the evaluation and interpretation of the study's results in search for possible variations of susceptibility and resistance patterns. These antibiotics, rifampicin, isoniazid, streptomycin, pyrazinamide, ethambutol, PAS, D-cycloserine, ethionamide, ciprofloxacin, ofloxacin, kanamycin, amikacin, capreomycin, and linezolid were chosen based on the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The data analysis revealed a prevalence of 6% for MTC and of 2% for NTM in 189 positive samples of 2459 total samples. These 189 samples represent 132 patients with positive results for MTC and 57 patients with identification of NTM. The AST were only conducted on samples of *Mycobacterium tuberculosis* (131), as one of the samples obtained an identification of BCG in the context of BCGitis, and antibiogram was not performed. Of the 131 samples studied, it was observed that the percentage of resistance and sensitivity varied over the 5 years of the study. The susceptibility profiles of the patients studied were 84.6% sensitive to all first-line drugs, 1.5% resistance to all first-line drugs, 0.8% resistance to INH, RIF and STR, 5.4% resistance to INH and STR, 0.8% resistance to PZA, and 1.5% resistance to INH.

The learnings from the past tell us that the solution to the global problem of tuberculosis cannot be based solely on new therapeutical weapons, more potent and effective. The challenge against this disease requires, above all, a strategy tailored for each country and an organization that supports it, as well as an effective struggle against poverty, illiteracy and underdevelopment. Ideally, a vaccine should be significantly effective in preventing tissue invasion by the bacillus; protect against primary and secondary tuberculosis; contribute to the destruction of persistent bacilli; and prevent endogenous reinfection.

*“Não devemos esquecer que o trágico na vida
não é não conseguir atingir um objetivo
mas sim não ter um objetivo pelo qual lutar”*

Benjamins Mays

Índice

1. Introdução	1
1.1. Breve enquadramento histórico	1
1.2. Epidemiologia	2
1.3. Características das Micobactérias	6
1.4. Patogénese e Imunidade	9
1.5. Sintomatologia – Doença Clínica	10
1.5.1. Tuberculose infantil.....	12
1.5.2. Tuberculose do Aparelho Respiratório.....	12
1.5.3. Tuberculose Sequelar do Pulmão e da Pleura.....	13
1.5.4. Pericardite tuberculosa	13
1.5.5. Tuberculose das Vias Aéreas Superiores	14
1.5.6. Tuberculose Ganglionar Extratorácica.....	14
1.5.7. Tuberculose do Aparelho Digestivo	14
1.5.8. Tuberculose do Aparelho Génito-Urinário.....	15
1.5.9. Tuberculose Cutânea	15
1.5.10. Tuberculose do Sistema Nervoso Central	16
1.5.11. Tuberculose do Aparelho Locomotor.....	16
1.5.12. Tuberculose das Supra-Renais	17
1.5.13. Tuberculose Ocular.....	17
2. Micobactérias não tuberculosas	18
3. Diagnóstico da Tuberculose.....	21
3.1. Diagnóstico Radiológico.....	21
3.2. Diagnóstico laboratorial cultural	23
3.3. Diagnóstico serológico	25
3.3.1. I.G.R.A.....	25
3.4. Diagnóstico Fenotípico.....	27
3.5. Diagnóstico Molecular.....	28
3.5.1. PCR- Polymerase Chain Reaction.....	29
3.5.2. Sondas de DNA.....	30
4. Quimioprofilaxia	32

4.1.	Antibióticos antituberculosos.....	32
4.2.	Suscetibilidade aos antibióticos	35
4.3.	Mecanismos de resistência a antimicrobianos.....	37
4.4.	Antibióticos de 1ª linha e resistências associadas	40
4.4.1.	Rifampicina.....	40
4.4.2.	Isoniazida	42
4.4.3.	Etambutol	44
4.4.4.	Pirazinamida.....	45
4.4.5.	Estreptomicina.....	46
4.5.	Antibióticos de 2ª linha.....	47
4.5.1.	PAS (ácido paraminosalicílico)	48
4.5.2.	Ciprofloxacina.....	48
4.5.3.	Ofloxacina	49
4.5.4.	D-Cicloserina	50
4.5.5.	Etionamida	51
4.5.6.	Canamicina	52
4.5.7.	Amicacina.....	53
4.5.8.	Capreomicina	54
4.5.9.	Linezolid	55
5.	Imunoprofilaxia	60
5.1.	Vacina BCG	60
6.	Prevenção e controle	63
7.	Justificação do Estudo.....	64
7.1.	Objetivos	64
7.2.	Amostra populacional	65
7.3.	Amostra laboratorial.....	65
7.4.	Tratamento estatístico.....	65
7.5.	Material e métodos	66
7.5.1.	Diagnóstico laboratorial e preparação da amostra no CHEDV	66
7.5.1.1.	Colheita de amostras para pesquisa de MTC.....	66
7.5.1.2.	Transporte e conservação de amostras.....	67
7.5.1.3.	Processamento de amostras para pesquisa de micobactérias.....	67
7.5.1.4.	Métodos de descontaminação	69

7.5.1.4.1.	Método de N-Acetil-L-Cisteína Hidróxido de Sódio (NALC-NaOH)	69
7.5.1.4.2.	Método do ácido sulfúrico a 4%	70
7.5.1.4.3.	Método do ácido oxálico a 5%	70
7.5.1.5.	Repicagem de culturas positivas em meio líquido	72
7.5.1.6.	Repicagem de culturas positivas em meio sólido (Lownstein- Jensen(L-J))	73
7.5.1.7.	Preparação de esfregaços para identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) – exame direto.....	74
7.5.1.8.	Técnicas de coloração para detecção de BAAR	74
7.5.1.8.1.	Coloração pela técnica de Gram	74
7.5.1.8.2.	Coloração de Ziehl-Neelsen	75
7.5.1.8.3.	Coloração de Auramina-Rodamina.....	76
7.5.1.9.	Meios de cultura	78
7.5.1.9.1.	Gelose chocolate (PVX)	78
7.5.1.9.2.	Meio de Lowenstein-Jensen (LJ).....	78
7.5.1.9.3.	Frascos de cultura BACTEC MYCO/F-Sputa.....	78
7.5.1.9.4.	Meio de cultura LYTIC.....	79
7.5.2.	Testes utilizados para execução de perfis de suscetibilidade do MTC no CHVNG/Espinho.....	80
7.5.2.1.	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	81
7.5.2.2.	Teste ProbeTec ET <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex Direct Detection	82
7.5.2.3.	Teste GenoType MTBDR <i>plus</i>	83
7.5.2.4.	Teste GenoType MTBDR <i>sl</i> (<i>second line</i>).....	83
7.5.3.	Técnicas para execução de perfis de suscetibilidade do MTC aos antimicrobianos de 2ª linha no INSA.....	84
7.5.3.1.	Técnica utilizada de 2006 a 2010.....	84
7.5.3.2.	Técnica utilizada de 2010 até à atualidade	85
8.	Resultados	86
8.1.	Caracterização da amostra total	86
8.2.	Estudo estatístico de amostras de MNT	88
8.3.	Análise estatística de amostras de MTC.....	93
9.	Discussão e Conclusão.....	106
10.	Perspetivas futuras	115
11.	Bibliografia.....	119
12.	Anexos	128
12.1.	Anexo 1	128
12.2.	Anexo 2.....	129

12.3.	Anexo 3.....	130
12.3.1.	Método de N-Acetil-L-Cisteína Hidróxido de Sódio (NALC-NaOH.....	130
12.3.2.	Método do ácido sulfúrico a 4%.	131
12.3.3.	Método do ácido oxálico.....	131
12.4.	Anexo 4.....	132
12.4.1.	Coloração de Gram.....	132
12.4.2.	Coloração de ZN.....	132
12.4.3.	Coloração da Auramina.....	133

Lista de Abreviaturas

ARN – Ácido ribonucleico

AST – *Antibiotic sensitivity tests*

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CDP – Centro de Diagnóstico Pneumológico

CHEDV – Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E.

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crónica

EMB – Etambutol

GC – Gelose de chocolate

GI – Gastrointestinal

HCL – Ácido clorídrico

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IM – Intramuscular

INE – Instituto Nacional de Estatística

INH – Isoniazida

IV – Intravenosa

LAM – Lipoarabinomanano

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

L-J – Lownstein-Jensen

MAC – Complexo *Mycobacterium avium*

MC – Membrana citoplasmática

MDR-TB – Multi Drug Resistance – Tuberculosis

MNT – Micobactérias Não Tuberculosas

mRNA – RNA mensageiro

MT – *Mycobacterium tuberculosis*

NaOH – Hidróxido de sódio

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NTM – *Nontuberculous Mycobacterium*

OM – Membrana externa

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAS – Ácido Paraminossalicílico

PC – Parede celular

pH – Potencial de hidrogénio

PM – Peso molecular

PNV – Plano Nacional de Vacinação

PZA – Pirazinamida

RIF – Rifampicina

RPM – Rotações por minuto

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNC – Sistema Nervoso Central

SPC – Serviço de Patologia Clínica

STR – Streptomina

TSA – Testes de sensibilidade a antimicrobianos

XDR-TB – Extensively Drug Resistance – Tuberculosis

Lista de Figuras

Figura 1 – Incidência estimada de casos de tuberculose mundial, em 2010, segundo a OMS.	3
Figura 2 – Casos reportados de MDR-TB, segundo a OMS.....	5
Figura 3 – Países que reportaram pelo menos um caso de XDR-TB, segundo a OMS.....	5
Figura 4 – Bacilos álcool-ácido resistentes (Coloração de Ziehl-Neelsen) (Ferreira, W. et al, 2000).....	7
Figura 5 – Estrutura membranar da parede celular de uma bactéria Gram positiva (Ferreira, W. 2010).	7
Figura 6 – Estrutura da parede celular das micobactérias.....	8
Figura 7 – Disseminação linfática. No lado A, tomografia registada em janela de parênquima demonstra opacidades de limites imprecisos localizada no lobo superior direito, exibindo disseminação linfática local em direcção ao hilo pulmonar, também visualizada na janela mediastinal (lado B).	22
Figura 8 – Tuberculose residual. A radiografia revela múltiplos nódulos calcificados associados a nódulos linfáticos também calcificados no hilo esquerdo (Capone, D. et al, 2006)	22
Figura 9 – Células de MTC visualizadas por microscopia eletrónica.....	34
Figura 10 – Prevalência de casos de pacientes HIV positivos em novos casos de tuberculose, em 2010, segundo a OMS.	39
Figura 11 – Estrutura química da rifampicina (Sousa, J. 2006).	41
Figura 12 – Estrutura química da isoniazida (Sousa, J. 2006).	43
Figura 13 – Estrutura química do etambutol (Sousa, J. 2006).....	45
Figura 14 – Estrutura química da pirazinamida (Sousa, J. 2006).	46
Figura 15 – Estrutura química da estreptomicina (Sousa, J. 2006).	47
Figura 16 – Estrutura química do PAS.	48
Figura 17 – Estrutura química da ciprofloxacina (Sousa, J. 2006).....	49
Figura 18 – Estrutura química da ofloxacina.	50
Figura 19 – Estrutura química da D-cicloserina.....	51
Figura 20 – Estrutura química da etionamida.....	51
Figura 21 – Estrutura química da canamicina.	52
Figura 22 – Estrutura química da amicacina (Sousa, J. 2006)	53
Figura 23 – Estrutura química da capreomicina.	54
Figura 24 – Estrutura química do linezolid (Sousa, J. 2006)	55
Figura 25 – Prova de Mantoux e leitura da reação.....	62
Figura 26 – Colónias de MTC em meio sólido de LJ.....	73
Figura 27 – Bacilos de MTC corados de vermelho pela técnica de Ziehl-Neelsen (Ferreira, W., 2010; Sousa, J., 2006)	75

Figura 28 – Colorações ácido resistentes de MTC corado com as colorações fluorescentes de Auramina e Rodamina. (Forbes, B. et al, 1998; Maza, L. et al, 1999; Murray, P. et al, 2006)	77
Figura 29 - Fagos	116

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação das micobactérias de acordo com o tempo de crescimento e produção de pigmento, segundo Runyon, em 1959 (Ferreira et al, 2000; Vranjac, 2005)	27
Tabela 2 – Esquema terapêutico da tuberculose, segundo normas da OMS.	36
Tabela 3 – Efeitos secundários mais descritos na terapia com antituberculosos. (Lorent, N. et al, 2011; Mitnick, C. et al, 2009; Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).	59
Tabela 4 – Distribuição de MNT por ano de estudo.	92
Tabela 5 – Distribuição do número de amostras estudadas por ano de estudo.	95
Tabela 6 – Esquema de tratamento para a ITBL.....	128
Tabela 7 – Esquema terapêutico para as MNT.	129

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Caracterização da amostra total por sexo.....	86
Gráfico 2 – Caracterização da amostra total por faixa etária.....	86
Gráfico 3 – Prevalência de resultados da amostra total.	87
Gráfico 4 – Caracterização das amostras com resultado positivo.	88
Gráfico 5 – Caracterização das amostras com resultado positivo por sexo.....	88
Gráfico 6 – Distribuição por sexo dos pacientes com MNT.	89
Gráfico 7 – Prevalência de MNT estudadas.....	89
Gráfico 8 – Caracterização das MNT pesquisadas por sexo.....	90
Gráfico 9 – Prevalência de casos de MNT por faixa etária.....	91
Gráfico 10 – Distribuição de MNT por mês.	92
Gráfico 11 – Caracterização por sexo dos pacientes estudados para MTC.	93
Gráfico 12 – Caracterização dos pacientes com MTC por sexo e faixa etária.....	94
Gráfico 13 – Distribuição de estirpes de MTC, estudadas por faixa etária.	94
Gráfico 14 – Relação entre número de casos, ano e sexo de amostras de MTC.....	95
Gráfico 15 – Distribuição de amostras positivas para MTC por mês de colheita.	96
Gráfico 16 – Distribuição de estirpes de MTC por produto biológico.	97
Gráfico 17 – Distribuição de estirpes de MTC por proveniência de serviço hospitalar.....	98
Gráfico 18 – Perfil de suscetibilidade aos antibióticos de 1ª linha nas amostras de MTC.....	99
Gráfico 19 – Perfis de suscetibilidade do MTC em todos os pacientes.	100
Gráfico 20 – Perfil de suscetibilidade à rifampicina durante os 5 anos de estudo.	101
Gráfico 21 – Perfil de suscetibilidade à isoniazida durante os 5 anos de estudo.....	102
Gráfico 22 – Perfil de suscetibilidade à estreptomicina durante os 5 anos de estudo.....	103
Gráfico 23 – Perfil de suscetibilidade ao etambutol durante os 5 anos do estudo.....	103
Gráfico 24 – Perfil de suscetibilidade à pirazinamida durante os 5 anos de estudo.	104
Gráfico 25 – Prevalência de casos de HIV com MNT e MTC.	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. Breve enquadramento histórico

A tuberculose acompanha o homem provavelmente desde o início da civilização. Alguns relatos descrevem que múmias egípcias de 3000 anos antes de Cristo apresentavam claras evidências de lesões ósseas de origem tuberculosa. O termo tuberculose foi pela primeira vez utilizado por Schönlein na primeira metade do século XIX, e deriva do latim *tuberculo*, diminutivo de *tuber*, que significa pequeno nó ou saliência. A doença era classificada como uma condenação na vida, um castigo divino a quem se alimentava mal, uma fraqueza por vida desregrada. Normalmente queimavam-se as roupas, objetos e colchões por medo de contágio. A ausência de tratamento eficaz levava normalmente à morte dos doentes (Álvares, E. 2009; Capone, D. et al, 2006; Forbes, B. et al 1998; Lago, J. 2009; Pina, J. 2000; Sérgio, J. et al, 2004).

O século XIX revela-se decisivo no aprofundamento do conhecimento da tuberculose, através de cientistas de grande saber, que aproveitando os avanços da ciência empurraram a medicina para a era da modernidade.

A 24 de Março de 1882, em Berlim, Robert Koch, na presença de figuras ilustres, apresentou à Sociedade de Fisiologia Berlinense uma comunicação intitulada *Die Aetiologie der Tuberculose* onde dizia de forma irrefutável que tinha descoberto o microrganismo responsável pela doença (que permitiu o diagnóstico laboratorial de tuberculose), que passaria a ser batizado com o seu nome, “Bacilo de Koch”. Utilizando uma metodologia segura baseada em quatro requisitos, nomeadamente, identificação e isolamento do agente, estudo das características biológicas a partir da cultura, inoculação do material da cultura em animais suscetíveis, reproduzindo nestes a doença em todos os aspetos, e a recuperação dos microrganismos a partir destes animais, com novo desenvolvimento em meio cultural, Koch não só isolou o *Mycobacterium tuberculosis*, como concluiu que os bacilos da tuberculose só encontram condições ótimas de reprodução em organismos de animais vivos e que a principal fonte de contágio era a expetoração de doentes tuberculosos (Álvares, E. 2009; Pina, J. 2000; Ferreira, W. et al, 2005; Ferreira, W. 1998; Lago, J. 2009).

Por estes e outros feitos, como a produção de tuberculina (que viria mais tarde a tornar-se uma importante arma diagnóstica), Koch seria em 1905 galardoado com o Prémio Nobel da Medicina, e cem anos após a sua descoberta, a data de 24 de Março ficou marcada como o Dia Mundial da Tuberculose (Lago, J. 2009; Pina, J. 2000).

Em 1895, um físico alemão, Wilhelm Conrad Röntgen, descobriu a radiação ionizante (raio x), que permitiu o diagnóstico radiológico da doença. Tal descoberta permitia não só visualizar as lesões causadas nos seres vivos, como também seria um meio de diagnóstico da doença (Capone, D. et al, 2006; Pina, J. 2000).

O facto de se saber que a tuberculose era uma doença contagiosa com elevadas taxas de incidência e de mortalidade, que atingiam valores elevados em cidades europeias, aliado ao facto de não existir qualquer medida terapêutica eficaz, fez surgir os sanatórios. Apesar de este regime sanatorial não se ter revelado eficaz na cura da tuberculose, teve a vantagem de não permitir a propagação de contágios (Lago, J. 2009; Mandell, G. et al 2005; Pina, J. 2000).

Em 1913, os médicos Albert Calmette e Camille Guérin descobrem que ao emulsionar culturas de bacilos bovinos em meio contendo glicerina e bÍlis de boi, estes vão perdendo virulência. Após algumas centenas de culturas obtêm uma estirpe de bacilos sem virulência mas com as suas capacidades imunogénicas mantidas. Este passou a chamar-se Bacilo de Calmette-Guérin, mais tarde conhecido por BCG (Pina, J. 2000). Esta viria a tornar-se em 1921 a primeira vacina antituberculosa (Álvares, E. 2009; Pina, J. 2000).

Nas décadas de 50, 60 e 70 foram adotadas medidas de terapêutica antibacilar combinada, de tratamento ambulatorio e de esquemas de curta duração, na tentativa de resolução do problema a nível mundial, onde os países mais desenvolvidos registavam menor incidência da doença. No entanto, nos Estados Unidos surgiu um novo problema que viria a agravar estas medidas: o aparecimento da epidemia pelo HIV. Os casos de tuberculose em doentes imunodeprimidos aumentaram, o que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar a tuberculose como uma emergência global de um grave problema de saúde pública (Álvares, E. 2009; Mandell, G. et al 2005).

Em 1998 foi decifrada a sequência completa do genoma do *Mycobacterium tuberculosis*, o que permitiria a curto prazo uma melhor compreensão da biologia deste microrganismo, e simultaneamente prever a descoberta de novas armas profiláticas e de terapêuticas que se traduzirão numa maior eficácia no combate a esta doença (Pina, J. 2000).

1.2. Epidemiologia

A tuberculose mantém-se como uma das principais causas de morte em todo o mundo provocadas por um único agente infeccioso. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um terço da população mundial está infetada com *Mycobacterium tuberculosis*

(MT). Um total de 8,8 milhões de novos casos são reportados anualmente, assim como cerca de 3 milhões de mortes por tuberculose ocorrem a cada ano. Torna-se portanto um problema de saúde pública. É também declarado que anualmente existem mais de 70.000 casos que desenvolvem mecanismos de resistência (BD, 2010; Capone, D. et al, 2006; Guendouzi, S. et al, 2011; Huang, H. et al, 2010; Murray, P. et al 2006; Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002; Teixeira, H. et al, 2007). Nos Estados Unidos o número de novos casos tem vindo a diminuir para cerca de 15.000/ano (Mandell, G. et al 2005; Murray, P. et al 2006; Murray, P. et al 2003; Salomon, J. et al, 2006; WHO, 2010).

Apesar do aumento dramático do número de casos a nível mundial, a tuberculose tornou-se uma doença muito pouco frequente em países desenvolvidos, devido ao enorme sucesso dos programas de controlo. No entanto, este sucesso contrasta com o agravamento da situação global e o facto de 98% das cerca de 3 milhões de mortes por tuberculose a cada ano ocorrerem nos países subdesenvolvidos (Huang, H. et al, 2010; Murray, P. et al, 2003; Pina, J. 2000). A doença é portanto mais comum em países do Sudeste Asiático, África subsariana e Europa Oriental, tal como podemos visualizar na Figura 1.

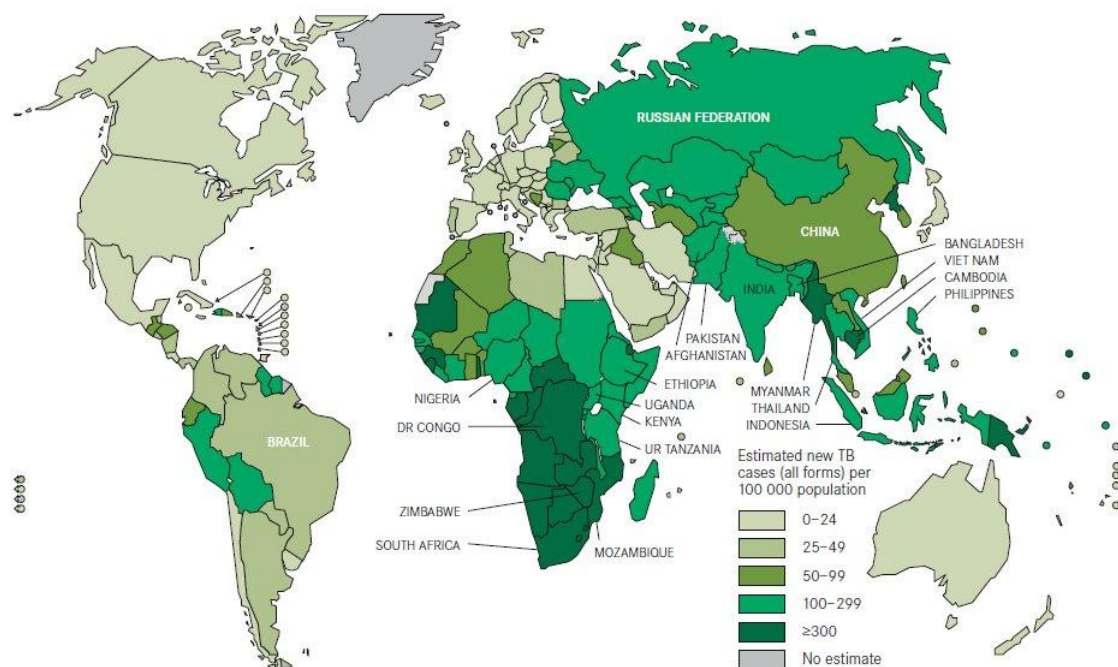


Figura 1 – Incidência estimada de casos de tuberculose mundial, em 2010, segundo a OMS.

A evolução da infecção de tuberculose nos países subdesenvolvidos é uma constante preocupação das entidades de saúde. Estão declarados 1,6 milhões de novos casos na África subsariana e 3 milhões no sudeste asiático, o que leva a um aumento da incidência global em 0,4%/ano (Álvares, E. 2009). Nestes países, a mortalidade ocorre em cerca de 40% dos infectados por tuberculose, comparativamente com os 7% de mortes por tuberculose em países desenvolvidos (Guendouzi, S. et al, 2011).

As populações com maior risco para a doença são pacientes imunocomprometidos (doentes com SIDA), utilizadores de drogas e alcoólicos, sem-abrigo, e profissionais de saúde. A transmissão da tuberculose ocorre essencialmente através da inalação de gotículas/aerossóis infecciosos (Forbes, B. et al 1998; Murray, P. et al 2006).

Como lema de uma luta reforçada para fazer face aos novos desafios da epidemia, a OMS lançou a campanha “STOP TB – use DOTS”, baseada em cinco pontos: decisão política, exame microscópico, adequado fornecimento de antibióticos, toma diretamente observada (TDO) e responsabilidade. A TDO é a medida que causa maior controvérsia.

Estudos efetuados pela OMS em cinco regiões do mundo revelam que, com o atual nível baixo de implementação da estratégia DOTS, haverá 225 milhões de novos casos e 79 milhões de mortes por tuberculose até ao ano 2030 (Pina, J. 2000).

Em 2006, segundo a OMS, estimou-se que o número de casos de tuberculose a nível mundial atingia valores de 9,2 milhões de casos (139 por 100.000 habitantes) (OMS, 2009).

Em 2007, a OMS estimou a existência de 500.000 novos casos de MDR-TB (Multi-Drug Resistance – Tuberculosis), sendo que 85% desses casos pertencem a 27 países, 15 deles europeus (Guendouzi, S. et al, 2011) (Figura 2).

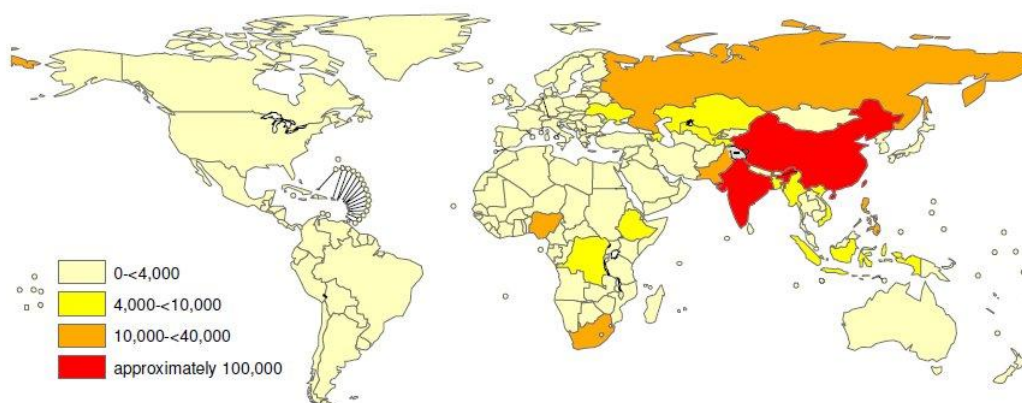


Figura 2 – Casos reportados de MDR-TB, segundo a OMS.

Até ao final de 2008, segundo a OMS, mais de 55 países reportaram pelo menos um caso de XDR-TB (Extensively Drug Resistance- Tuberculosis), incluindo Portugal (Guendouzi, S. et al, 2011; WHO, 2008) (Figura 3).



Figura 3 – Países que reportaram pelo menos um caso de XDR-TB, segundo a OMS.

Desde a sua primeira descrição em Março de 2005 pelo *US Centers for Disease Control and Prevention* (Holtz, 2007), a XDR-TB tem-se tornado um dos maiores obstáculos ao controlo internacional da tuberculose, comprometendo o progresso alcançado em muitos países na última década (Dye, C. et al, 2007). Apesar das potenciais consequências

poderem manifestar-se maioritariamente nos países com elevada prevalência de MT e HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), a XDR-TB constitui já um sério problema em muitas outras partes do mundo.

Um estudo efetuado em Trinidad e Tobago, em 2006, revela que este país apresenta uma incidência anual de 17 novos casos de tuberculose por 100.000 habitantes. Comparativamente com o Haiti (299/100.000), República Dominicana (89/100.000), considera-se que a incidência em Trinidad e Tobago é moderada (Baboolal, S. et al, 2009).

Em 2006 foram notificados 3092 novos casos de tuberculose em Portugal, com maior incidência nos distritos do Porto e Lisboa (45,4 e 38,9 por 100 mil habitantes, respetivamente). Está descrito que anualmente são infetadas cerca de 3.000 pessoas. Portugal é o país da Europa com maior incidência de tuberculose (28/100.000 habitantes), com uma proporção de casos de MDR-TB de 1,7% (entre novos casos e recidivas), dos quais 22% foram de XDR-TB (DGS, 2006). Em 2007 foram declarados 27 novos casos por 100.000 habitantes, sendo que a média da União Europeia revela cerca de 12,8 novos casos por 100.000 habitantes (Álvares, E. 2009). As causas do aumento da incidência de tuberculose devem-se ao lento desenvolvimento sócio-económico, a um aumento do movimento migratório de países de maior incidência da infeção, e à negligência de medidas curativas.

1.3. Características das Micobactérias

O género *Mycobacterium*, único da família *Mycobacteriaceae*, da ordem *Actinomycetales* e classe *Schizomycetes*, é constituído por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* e outras denominadas de micobactérias não tuberculosas (Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Lago, J. 2009; Mandell, G. et al, 2005; Marmion, B. P. et al, 1993; Murray, P. et al, 2003; Vranjac, 2005).

Trata-se de bactérias aeróbias, imóveis, não capsuladas e não formadoras de esporos. Habitualmente, a maioria das espécies apresenta uma morfologia bacilar ou cocobacilar, e mais raramente formas filamentosas. Caracteristicamente são bacilos finos, retos ou ligeiramente encurvados, apresentando-se isolados, aos pares ou em pequenos agrupamentos de bacilos paralelos (Ferreira, W. et al, 2000; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003).

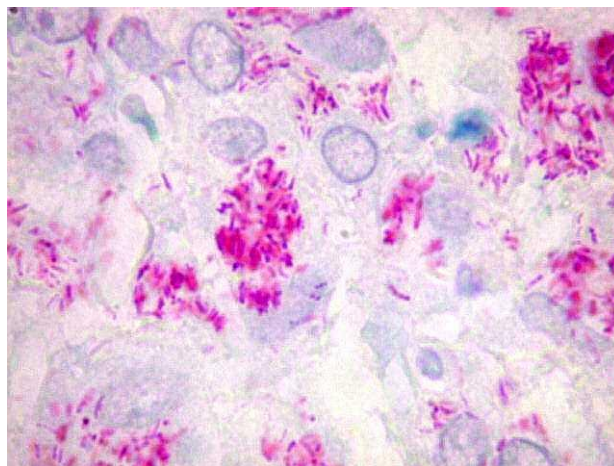


Figura 4 – Bacilos álcool-ácido resistentes (Coloração de Ziehl-Neelsen) (Ferreira, W. et al, 2000).

As micobactérias possuem uma parede celular complexa e rica em lípidos, que lhes confere propriedades como resistência a ácidos, crescimento lento, resistência a detergentes e antibióticos, antigenicidade e aglutinação. A estrutura básica da parede celular é típica de bactérias de Gram positivo: uma membrana plasmática interna recoberta por uma espessa camada de peptidoglicanos, sem membrana externa. São considerados bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Jawetz et al, 2005; Marmion, B. P. et al, 1993; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2006; Murray, P. et al, 2003).

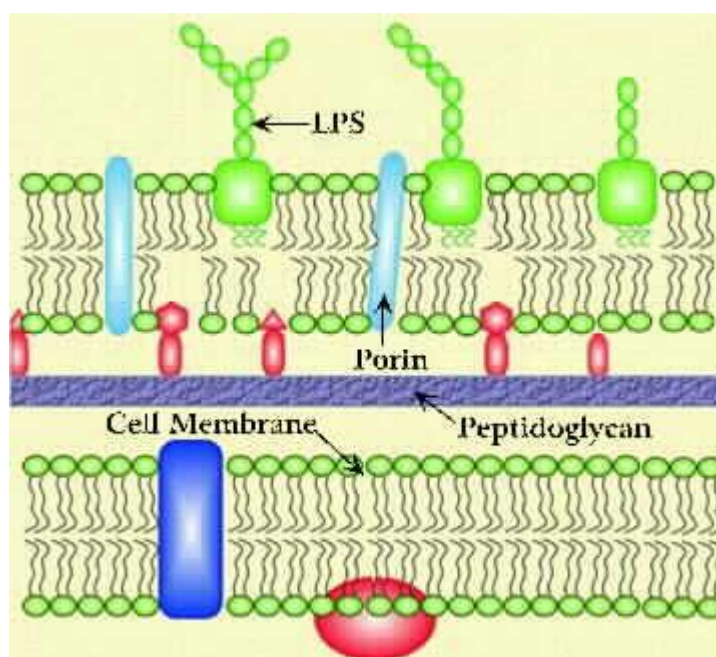


Figura 5 – Estrutura membranar da parede celular de uma bactéria Gram positiva (Ferreira, W. 2010).

No entanto, a estrutura da parede celular das micobactérias é muito mais complexa que das outras bactérias de Gram positivo, pois possuem componentes como proteínas, manosídios de fosfatidilinositol e lipoarabinomanano (LAM), que se encontram ancorados na membrana plasmática (Murray, P. et al, 2003; Murray, P. et al, 2006). O LAM está funcionalmente relacionado aos lipopolissacarídeos antigénio O, presentes em outras bactérias. A camada de peptidoglicanos forma a base sobre a qual se ligam arabinogalactanos, que são polissacarídeos ramificados formados por D-arabinose e D-galactose. O resíduo terminal de D-arabinose é esterificado formando ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular, com moléculas glicolípídicas ligadas a superfície, estando também presentes lipídeos, glicolipídeos e peptidoglicolipídeos (ver Figura 6). Os componentes lipídicos compõem 60% do peso da parede celular (PC). As proteínas são antígenos biologicamente importantes, estimulando a resposta imune celular do paciente contra a infeção (Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Jawetz et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Murray, P. et al, 2006).

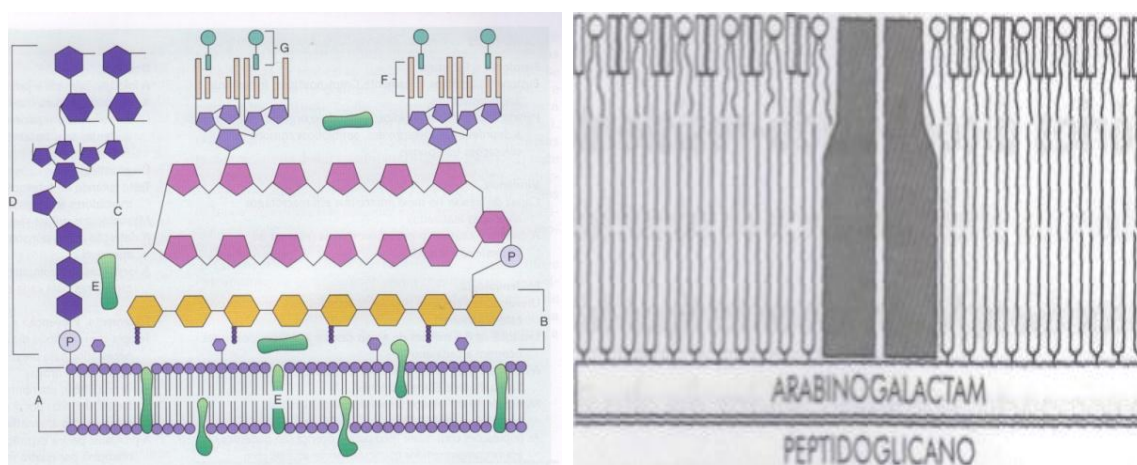


Figura 6 – Estrutura da parede celular das micobactérias.

Os componentes da parede celular das micobactérias incluem (A) a membrana plasmática, (B) peptidoglicanos, (C) arabinogalactano, (D) lipoarabinomanano recoberto por manose, (E) proteínas associadas a à membrana plasmática e à parede celular, (F) ácidos micólicos e (G) moléculas glicolípídicas de superfície associadas aos ácidos micólicos. (Redesenhado de Karakousis et al: Cell Microbiol 6:105-116, 2004, in Murray, P. et al, 2006). Na figura à direita, podemos visualizar a camada externa da PC do MT, onde podemos observar as cabeças polares dos fosfolípidos, sulfolípidos e glicolípidos, e as cadeias de hidrocarbonetos dos ácidos micólicos estão dispostas perpendicularmente à superfície celular.

1.4. Patogénese e Imunidade

Na ação patogénica do MT são responsáveis fatores de virulência bacilares e intervenientes celulares e humorais das respostas imunitária e inflamatória do hospedeiro. Consoante a predisposição genética e o grau de imunidade do hospedeiro, tanto se desenvolvem mecanismos que tendem a controlar a infeção e a extensão da reação imunopatológica a compostos bacilares (o que acontece a 90% dos infectados imunocompetentes), como poderão constituir-se vias de suscetibilidade nesses mecanismos, conducentes à doença, com extensão lesional e gravidade variáveis (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Pina, J. 2000; Teixeira, H. et al, 2007).

O bacilo de Koch atinge primariamente os pulmões e, em indivíduos não previamente expostos, é responsável pela doença em cerca de 5% a 15% dos casos (Álvares, E. 2009; Capone, D. et al, 2006; Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Pina, J. 2000).

O MT é um patogénio intracelular facultativo capaz de provocar uma infeção que permanece toda a vida no hospedeiro. No momento de exposição à infeção, o MT penetra nas vias aéreas, e as micropartículas infecciosas (cerca de 1-2µm) atingem os alvéolos pulmonares onde são fagocitadas por macrófagos alveolares, constituindo o foco inicial ou primário da infeção (Álvares, E. 2009; Capone, D. et al, 2006; Jawetz et al, 2005; Sérgio, J. et al, 2004). Ao contrário de outras bactérias fagocitadas, o MT impede a fusão do fagócito com os lisossomas, permitindo ao fagócito a união com outras vesículas intracelulares, permitindo o acesso a nutrientes e facilitando a replicação no interior do vacúolo. As bactérias fagocitadas são também capazes de escapar à destruição por macrófagos (mediada por intermediários nitrogenados reativos formados entre o óxido nítrico e aniões superóxidos), metabolizando cataliticamente os oxidantes formados. A doença é causada principalmente pela resposta do hospedeiro à infeção (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Murray, P. et al, 2006; Sérgio, J. et al, 2004; Teixeira, H. et al, 2007).

No hospedeiro podem existir três tipos de população de *M. tuberculosis*:

- Nas **lesões cavitárias**, em que as células das micobactérias habitam em ambiente neutro ou ligeiramente alcalino, com alta tensão em oxigénio, o que permite o seu rápido crescimento;

- Nas **lesões caseosas**, em que as células das micobactérias se encontram em meio neutro ou ácido, com baixa tensão de oxigénio e baixa replicação;
- No **interior dos macrófagos**, onde as células habitam em baixa tensão de oxigénio, neutro ou ácido e com baixa replicação (Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Sérgio, J. et al, 2004; Sousa, J. 2006).

1.5. Sintomatologia – Doença Clínica

Embora a tuberculose se possa desenvolver em qualquer órgão, em pacientes imunocompetentes está normalmente restrita aos pulmões. O foco da infeção normalmente localiza-se na zona média ou inferior do pulmão, onde os bacilos tuberculosos se multiplicam livremente. A imunidade celular do paciente é ativada e a multiplicação das micobactérias cessa na maioria dos pacientes após 3 a 6 semanas de exposição ao microrganismo. Aproximadamente 5% dos pacientes expostos ao MT progridem para doença ativa em cerca de 2 anos e outros 5% a 10% irão apresentá-la em algum momento da vida (Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Murray, P. et al, 2006; Teixeira, H. et al, 2007).

A probabilidade de infeção depende da dose infecciosa que foi transmitida, assim como da capacidade de resposta imunológica do paciente. No caso dos doentes HIV-positivos, com baixa contagem de linfócitos T CD4, a doença desenvolve-se em cerca de 1 ano em 10% dos doentes, enquanto que nos pacientes imunocompetentes esta desenvolve-se em cerca de 10% durante toda a sua vida (Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2006; Pina, J. 2000; Sérgio, J. et al, 2004; Teixeira, H. et al, 2007).

Os sinais e sintomas clínicos de infeção por tuberculose refletem o local da infeção. Normalmente a doença primária está restrita ao trato respiratório inferior. Os sintomas mais comuns são queixas inespecíficas de mal-estar geral, anorexia e emagrecimento, tosse seca, irritativa e produtiva, e sudorese nocturna. O esputo pode ser em quantidades reduzidas, sanguinolento e purulento, uma vez que resulta do exsudado de lesões parenquimatosas drenado para a árvore brônquica. A produção de esputo com hemoptises está associada à destruição tecidual (doença cavitária) (Álvares, E. 2009; Forbes, B. et al, 1998; Murray, P. et al, 2006; Pina, J. 2000). A toracalgia surge quando o processo infeccioso atinge a pleura parietal, habitualmente na presença de derrame pleural, que origina a dor pleurítica que se exacerba com os movimentos respiratórios. A febre normalmente não ultrapassa os 38°C e surge no período vespertino. A pieira e a

dispneia asmatiforme, de início súbito, poderão ser outras manifestações de tuberculose. Se houver destruição extensa do pulmão pode ocorrer insuficiência respiratória (Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Pina, J. 2000; Sérgio, J. et al, 2004).

A tuberculose é uma doença infecciosa que pode atingir praticamente qualquer local do organismo humano, sendo contudo rara a infecção dos músculos estriado e cardíaco. (Pina, J. 2000). A espécie humana é o reservatório natural do MT e a transmissão da doença ocorre praticamente apenas entre indivíduos, sendo as portas de entrada mais frequentes no organismo humano o aparelho respiratório (em mais de 90% dos casos), o trato digestivo, as amígdalas, a conjuntiva ocular, a pele e o trato genital (Pina, J. 2000).

Os mecanismos patogênicos da tuberculose explicam a diversidade da sua expressão clínica. Assim, após a inalação de bacilos, e uma vez ultrapassada a barreira muco-ciliar nasal e brônquica, quer a nível do parênquima pulmonar, quer a nível dos gânglios linfáticos pulmonares, decorrem um conjunto de complexos mecanismos que têm como objetivo neutralizar a agressão micobacteriana. Estes mecanismos são na grande maioria dos casos eficazes, quer na neutralização da infecção primária, quer na sua confinação ao pulmão. No entanto, quase sempre, um número reduzido de bacilos escapam aos filtros parênquimatoso e ganglionar, e levados pela circulação linfática e sanguínea poderão alojar-se em qualquer local do organismo, com particular frequência (devido a mecanismos circulatórios) nos lobos superiores dos pulmões, onde após um período de latência variável pode originar tuberculose – tuberculose pós-primária (Pina, J. 2000; Sérgio, J. et al, 2004).

Em consequência desta sucessão de mecanismos patogênicos, a expressão clínica da tuberculose depende do local ou órgão atingido.

A tuberculose extrapulmonar pode decorrer como resultado da disseminação hematológica dos bacilos da tuberculose durante a fase inicial de multiplicação, podendo não existir evidências de doença pulmonar em pacientes com tuberculose disseminada (tuberculose miliar) (Murray, P. et al, 2003; Murray, P. et al, 2006). Segundo a OMS, são consideradas tuberculose extrapulmonar todas as formas de tuberculose que se localizam fora do pulmão, que resultam de três contextos patogênicos diferentes: disseminação por via intracanalicular (pessoa a pessoa), através de gotículas que contêm bacilos ativos, tal como acontece na tuberculose brônquica, laríngea e gastrointestinal; extensão por contiguidade, tal como na tuberculose pleural, pericárdica e peritoneal; em consequência da disseminação linfo-hematogénica, quer na primoinfecção, quer nas

reativações posteriores das infecções primárias. As reativações são consequência da falência dos processos imunitários locais e gerais do organismo (Pina, J. 2000).

1.5.1. Tuberculose infantil

As manifestações clínicas mais graves da tuberculose são encontradas nas idades pediátricas, sendo tanto mais graves quanto mais nova é a criança, do qual resulta uma imaturidade imunológica muito superior, que se alia a uma completa dependência social, facilitando a exposição ao contágio. As taxas de mortalidade de meningite tuberculosa e tuberculose miliar abaixo dos 5 anos sempre foram consideradas, a par da incidência global, os indicadores mais importantes sobre a evolução da endemia tuberculosa numa comunidade, região, país e continente (Pina, J. 2000).

A tuberculose infantil, ou tuberculose da criança e do jovem adolescente, é a que se verifica no grupo etário dos 0 aos 15 anos e compreende 3 estadios: exposição, infecção e doença. A exposição revela que a criança esteve ou continua a estar em contacto com um portador da doença em fase contagiosa, mas apresenta prova da tuberculina negativa, exame objetivo normal e raio x sem alterações. A infecção revela uma criança com prova da tuberculina positiva, sem sintomas ou sinais da doença, raio x normal ou com granuloma ou calcificações do pulmão. A fase de doença caracteriza-se pela presença de sinais e sintomas característicos de tuberculose, assim como alterações radiográficas. A prova da tuberculina apresenta-se positiva em mais de 80% dos casos e a tuberculose pode ser pulmonar ou extrapulmonar (Pina, J. 2000).

1.5.2. Tuberculose do Aparelho Respiratório

O MT invade o organismo, normalmente por via inalatória, ultrapassando a barreira mucociliar brônquica e atinge os pulmões. Aqui, é confrontado com os macrófagos, as primeiras células que o tentam neutralizar. No entanto, o MT produz enzimas capazes de destruir os macrófagos alveolares, originando um ambiente de inflamação ou necrose com características particulares, o *caseum*. O elemento principal da tuberculose pulmonar é a cavidade parênquimatosa – caverna – resultante da drenagem para a árvore brônquica de um foco caseoso, mais ou menos extenso. É nesta estrutura morfológica que se encontram os bacilos viáveis, com excelentes condições de multiplicação. O que caracteriza a infecção tuberculosa é a capacidade dos bacilos ficarem quiescentes após um processo de infecção primária, e em mais de 90% dos casos não

origina doença clínica. Isto acontece nos indivíduos infetados, mas saudáveis e assintomáticos, sendo que a única evidência de doença possível seja uma prova de tuberculina positiva. Este estágio “inativo” da doença é o mais problemático, uma vez que uma reativação pode levar ao desenvolvimento de formas graves de tuberculose, tais como a tuberculose óssea, renal, miliar e meníngea. O risco de reativação de uma tuberculose pulmonar não tratada é tanto maior quanto menor o grupo etário (Pina, J. 2000).

A tuberculose pulmonar divide-se em tuberculose primária e pós-primária. A tuberculose primária desenvolve-se após a primeira exposição ao bacilo da tuberculose. A tuberculose pós-primária caracteriza-se por uma reativação de um foco primário quiescente, face a circunstâncias favorecedoras do hospedeiro, tais como diabetes, imunodepressão, iatrogenia (resultado de um tratamento médico), desnutrição, silicose, gastrectomia e hemodiálise.

1.5.3. Tuberculose Sequelar do Pulmão e da Pleura

A progressiva melhoria nos cuidados de saúde, com consequente redução do número de casos de tuberculose, o diagnóstico precoce e a introdução de fármacos antituberculosos nas fases iniciais da doença vieram reduzir de forma importante as sequelas graves de tuberculose. A tuberculose sequelar define-se como um *“estado patológico, resultante de intervenções terapêuticas ou de alterações anatomo-patológicas decorrentes durante o processo de cura da tuberculose e que motivam, a posteriori, a necessidade de intervenção clínico-terapêutica”* (Pina, J. 2000). As sequelas pulmonares dividem-se em sequelas ganglionares, brônquicas, parenquimatosas, pleurais e sequelas resultantes de medidas terapêuticas (Pina, J. 2000).

1.5.4. Pericardite tuberculosa

Até há alguns anos, a pericardite tuberculosa era, entre nós, uma patologia rara. Com o aparecimento da infeção pelo HIV, tem-se observado um aumento do número de casos, devido à maior prevalência de tuberculose neste grupo de doentes. Esta doença é portanto mais comum em casos de coinfeção com HIV, e nas áreas geográficas onde as populações têm condições de vida de extrema pobreza (Pina, J. 2000).

A tuberculose é a causa principal dos derrames pericárdios nos doentes infetados pelo HIV. O pericárdio é infetado por via linfática, hematogénia, ou mais frequentemente por propagação direta a partir de focos de tuberculose localizados nos gânglios traqueobrônquicos (Pina, J. 2000).

1.5.5. Tuberculose das Vias Aéreas Superiores

Os principais fatores de risco para uma infeção por tuberculose das vias aéreas superiores são a infeção por HIV, má nutrição, tabagismo e alcoolismo. As infeções que caracterizam este tipo de tuberculose podem começar na pirâmide nasal, fossas nasais e seios perinasais até aos brônquios, passando pela faringe, laringe e traqueia. As três vias principais de infeção são a via hemática, linfática e canalicular, pois explicam a patogénese da doença nas suas múltiplas localizações ao nível das vias aéreas superiores (Pina, J. 2000).

1.5.6. Tuberculose Ganglionar Extratorácica

A tuberculose ganglionar representa cerca de 20% dos casos de tuberculose extrapulmonar (Pina, J. 2000). O atingimento ganglionar periférico ou profundo, associado ou não a um comprometimento pulmonar, representa a localização extrapulmonar mais frequente nos países industrializados, assim como nos países em vias de desenvolvimento. A linfadenite tuberculosa representa a segunda forma mais comum de tuberculose extrapulmonar (a seguir à tuberculose génito-urinária). Infeta adultos jovens, nos países ocidentais, e crianças nos países em via de desenvolvimento, havendo um ligeiro predomínio no sexo feminino. Os imunodeprimidos e transplantados constituem o grupo de risco predominante (Pina, J. 2000).

1.5.7. Tuberculose do Aparelho Digestivo

A tuberculose do aparelho digestivo (muito frequente no início do século XX) regrediu na década de 60 e 70. Este declínio foi causado por diversos fatores, como a melhoria das condições de vida; a pasteurização do leite; o controlo da tuberculose bovina através do abate de animais doentes; e a introdução da terapêutica antimicobacteriana na década de 50. No entanto, os níveis desta doença têm aumentado novamente nos últimos anos, devido à disseminação não controlada da infeção pelo HIV, não só na Ásia, América do

Sul e África, como também nos países industrializados como os Estados Unidos da América. A tuberculose do aparelho digestivo pode ser classificada de acordo com as estruturas afetadas em tuberculose do tubo digestivo, peritoneal e visceral (Pina, J. 2000).

1.5.8. Tuberculose do Aparelho Génito-Urinário

A tuberculose renal é sempre bilateral, podendo a evolução das lesões ocorrer de forma diferente em cada um dos rins. A tuberculose renal e epididimária não são infeções separadas, mas sim manifestações da tuberculose em diferentes locais do mesmo processo de disseminação hematogénea da infeção. O atingimento do aparelho urinário e genital corresponde a uma disseminação hematogénea secundária da doença, que numa última análise pode significar uma falência da terapêutica, no sentido em que não terá sido erradicado na totalidade o bacilo responsável pela lesão pulmonar primária (Pina, J. 2000).

1.5.9. Tuberculose Cutânea

Na tuberculose cutânea estão incluídas as dermatoses de expressão clínica muito variada, em que é possível detetar-se o agente causal nas lesões, diretamente ou após cultura, e outras em que a etiologia tuberculosa é suspeita pela existência de granulomas tuberculóides característicos, forte reatividade à tuberculina e resposta à terapêutica antimicobacteriana. As tuberculosas cutâneas “verdadeiras” são causadas pelo MT, e ocasionalmente pelo *Mycobacterium bovis*, *africanum* ou mesmo pelo Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), estirpe atenuada do *M. bovis* (Pina, J. 2000).

A grande variabilidade clínica da tuberculose cutânea parece depender fundamentalmente da via de inoculação do agente e da capacidade de defesa do hospedeiro. A tuberculose cutânea pode ser classificada como: tuberculose por inoculação primária ou cancro tuberculoso; tuberculose verrucosa; lúpus vulgar; escrofuloderma; goma tuberculosa ou abscesso metastático tuberculoso; tuberculose orificial; tuberculose miliar cutânea; reações cutâneas à vacina BCG e tuberculides (líquen escrofulosorum, tuberculides pápulo-necróticas, eritema indurado de Bazin e eritema nodoso) (Pina, J. 2000).

1.5.10. Tuberculose do Sistema Nervoso Central

A tuberculose do sistema nervoso central (SNC) engloba três grupos principais de lesões: as meningites, os tuberculomas intracranianos e a doença medular (aracnoidites e granulomas intraparenquimatosos). A sua apresentação clínica é muito variável, desde os quadros de meningite aguda, aos de deterioração cognitiva progressiva, passando pela forma mais rara de encefalopatia grave, com convulsões e alterações do nível de consciência, mesmo na ausência de sinais clínico-laboratoriais de meningite (Pina, J. 2000).

O agente da tuberculose do SNC é quase sempre o MT. Outras micobactérias como o *Mycobacterium bovis* cuja infecção se contrai pela ingestão de leite contaminado, ou as micobactérias não tuberculosas ou atípicas (*Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*) são raramente causadoras de doença em humanos. A infecção é contraída por via inalatória. Os bacilos chegam ao pulmão e multiplicam-se nos alvéolos e macrófagos alveolares. Após disseminação hematogénea dos microrganismos, os órgãos pertencentes ao sistema reticuloendotelial (pulmão, baço, fígado e medula óssea) retém a maior parte deles, embora alguns possam atingir o parênquima cerebral e as meninges, onde vão formar pequenos nódulos encapsulados, com microrganismos latentes mas viáveis no seu interior (Pina, J. 2000).

1.5.11. Tuberculose do Aparelho Locomotor

A localização da tuberculose no sistema músculo-esquelético tem vindo a sofrer um acréscimo progressivo nos últimos anos, consequência de vários fatores dos quais se destacam a virulência do agente infeccioso e a diminuição da imunidade de determinados grupos de doentes. A destruição articular e a extensão do processo infeccioso para as partes moles com formação de abscessos e fistulização constituía a história natural da doença, em que a evolução para anquilose representava a cura transitória da infecção (Pina, J. 2000).

A localização de tuberculose nos tecidos moles, embora bastante rara, pode envolver as bolsas serosas e as bainhas tendinosas. O envolvimento dos músculos é habitualmente por extensão directa do osso vizinho. A tuberculose óssea pode ser classificada em tuberculose osteoarticular, vertebral e osteíte tuberculosa (Pina, J. 2000).

1.5.12. Tuberculose das Supra-Renais

As glândulas supra-renais podem ser infetadas por disseminação hematogénea secundária a uma tuberculose pulmonar. No entanto, uma insuficiência supra-renal primária só ocorre, em geral, após tuberculose evolutiva de longa duração e difícil tratamento (Pina, J. 2000).

1.5.13. Tuberculose Ocular

A tuberculose ocular é definida como o envolvimento de qualquer estrutura do olho pelo MT. Esta ressurge nos países desenvolvidos na última década devido à emigração, SIDA, utilização frequente de tratamentos imunossupressores e o aumento das resistências às drogas antimicobacterianas (Pina, J. 2000).

A tuberculose como doença granulomatosa sistémica, com disseminação hematogénica, apresenta-se de maneira multi-orgânica. O olho e os seus anexos podem ser infetados de modo direto, ou indiretamente com um quadro de inflamação. A infeção é resultante de um atingimento direto das estruturas oculares, por inoculação, por via aérea ou devido à bacteriémia que ocorre na tuberculose miliar. A inflamação é devida à reação de hipersensibilidade celular, provocada pelos anticorpos antituberculosos circulantes. O processo inflamatório ocular leva ao aparecimento de mecanismos imunitários, com elaboração intra-ocular de anticorpos e aparecimento de auto-imunização (Pina, J. 2000).

2. MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

As micobactérias não tuberculosas (MNT) encontram-se dispersas na natureza: na água, nas plantas e no solo, e ao contrário das espécies de MT, apresentam patogenicidade variável (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Lago, J. 2009; Mandell, G. et al, 2005; Marmion, P. et al, 1993; Miller et al, 1999; Murray, P. et al, 2003; Murray, P. et al, 2006; Prevots, D. et al, 2010; Vranjac, 2005).

A importância da capacidade das MNT produzirem doença vem aumentando progressivamente com isolamentos de diferentes espécies nos laboratórios de pesquisa de micobactérias. O diagnóstico de doença por MNT exige muito cuidado, pois o isolamento em amostras clínicas não estéreis do organismo pode significar colonização transitória ou contaminação (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Marmion, P. et al, 1993; Murray, P. et al, 2003; Vranjac, 2005).

As MNT presentes no meio ambiente podem colonizar um hospedeiro e determinar ou não o aparecimento de infecção ou doença (Vranjac, 2005).

As espécies do complexo MTC causam a tuberculose no homem e/ou animais. Esse complexo é composto pelas espécies MT, principal agente da tuberculose humana, *Mycobacterium bovis*, principal agente da tuberculose bovina, *Mycobacterium bovis*-BCG, *Mycobacterium africanum*, agente da tuberculose encontrado mais frequentemente em África, e *Mycobacterium microti* que causa tuberculose em roedores. São também conhecidos os *Mycobacterium caprae*, causadores de tuberculose nos caprinos e *Mycobacterium pinnipeddi*, que causa tuberculose nos leões-marinhos e no homem. Estas espécies são muito similares e apresentam 99,9% de identidade genética, possuindo a sequência 16S rRNA idêntica. No entanto, apresentam algumas diferenças fenotípicas, epidemiológicas e de patogenicidade (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Lago, J. 2009; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Vranjac, 2005).

As MNT também podem ser identificadas com base em testes fenotípicos (tempo de crescimento, produção ou não de pigmentos, provas bioquímicas, crescimento ou não na presença de inibidores químicos) e testes moleculares (PRA, PCR e sondas genéticas). (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000; Marmion, P. et al, 1993; Murray, P. et al, 2003; Vranjac, 2005). As MNT são também classificadas de acordo com a sua capacidade de causar doença no homem como potencialmente patogénicas ou não patogénicas. As MNT potencialmente patogénicas podem causar uma variedade de doenças em humanos

e animais que diferem em severidade e importância em saúde pública. As estirpes de MNT com mais isolamentos e mais patogênicas são: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium xenopi* e *Mycobacterium genevense*. (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Lago, J. 2009; Mandell, G. et al, 2005; Marmion, P. et al, 1993; Miller et al, 1999; Murray, P. et al, 2003; Murray, P. et al, 2006; Vranjac, 2005).

A doença por MNT ocorre geralmente em doentes com história prévia de doença pulmonar, como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), bronquite, tuberculose pré-existente, entre outras, assim como em doentes imunodeprimidos, submetidos a transplante renal, portadores de doenças linfoproliferativas e pacientes que utilizam drogas imunossupressoras. Os sintomas mais comuns incluem tosse crônica, febre, fadiga, hemoptises e perda de peso (Álvares, E. 2009; Forbes, B. et al, 1998; Marmion, P. et al, 1993; Murray, P. et al, 2003; Vranjac, 2005).

O complexo *Mycobacterium avium* é uma das MNT mais encontradas em pacientes, sendo portanto também a mais estudada. O complexo *Mycobacterium avium* consiste em duas espécies de bactérias: *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*, que dada a dificuldade em diferenciá-los foram agrupados no *Mycobacterium avium complex* (MAC). Ambas provocam doença em doentes imunocompetentes mas em pacientes HIV positivos é mais comum a infecção por *Mycobacterium avium*. Um novo perfil da doença surgiu em pacientes portadores de HIV, tornando a infecção pelo MAC a doença por micobactérias mais comum nos pacientes nos Estados Unidos. A infecção nestes doentes é disseminada, afetando praticamente todos os órgãos. A terapia retroviral nos portadores de HIV, e o uso rotineiro de profilaxia antibiótica, tornou a doença por MAC menos comum em doentes infetados com HIV. Embora alguns deles desenvolvam doença após exposição pulmonar, acredita-se que a maior parte das infecções se desenvolva após ingestão das bactérias. A transmissão pessoa a pessoa não tem sido demonstrada. As manifestações clínicas da doença só são observadas quando a massa de bactérias multiplicadas prejudica a função normal dos órgãos (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Marmion, P. et al, 1993; Miller et al, 1999; Murray, P. et al, 2003; Murray, P. et al, 2006).

As MNT são divididas em micobactérias de crescimento lento e micobactérias de crescimento rápido. As micobactérias de crescimento lento podem causar doenças humanas, principalmente em pacientes imunodeprimidos, como HIV positivos, portadores

de neoplasias malignas, transplantados e utilizadores de drogas imunossupressoras. As micobactérias de crescimento rápido raramente causam infeções disseminadas. Normalmente estão associadas a doenças que ocorrem após a exposição a bactérias em tecidos subcutâneos profundos, por trauma ou infeções (Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Murray, P. et al, 2006).

O tratamento das MNT depende da espécie envolvida, da extensão e forma de apresentação da doença, do perfil de sensibilidade aos fármacos e da condição clínica do doente. A cirurgia será realizada se a doença estiver localizada, sendo refratária à terapêutica médica (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003).

Os antibióticos e esquema terapêutico utilizados no tratamento das MNT podem ser visualizados na tabela nº 7 em anexo 2.

3. DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

3.1. Diagnóstico Radiológico

O diagnóstico de tuberculose ainda tem como base técnicas desenvolvidas há mais de um século, tais como a baciloscopia ou a cultura de produtos obtidos por expectoração em meios seletivos. Estas por vezes dificultam ou atrasam a rapidez do diagnóstico, assim como a prescrição da antibioterapia necessária. Neste caso, é importante conseguirmos um diagnóstico mais rápido, como o diagnóstico de probabilidade que tem como base os dados clínicos do paciente, a epidemiologia e sobretudo os resultados obtidos pelos exames de imagem (Capone, D. et al, 2006; Pina, J. 2000).

A radiografia do tórax constitui, em diversas ocasiões, a primeira abordagem diagnóstica em pneumologia, não só pelo seu baixo custo e facilidade de realização, mas sobretudo pelas inúmeras informações que proporciona ao clínico quando criteriosamente avaliada. A tomografia computadorizada (TAC) também ocupa um papel de destaque no diagnóstico radiológico, pois permite demonstrar com clareza as alterações parenquimatosas que a doença clínica provoca, caracterizar com maior precisão as cavidades e a sua evolução, detetar adenopatias mediastínicas e orientar punções e biópsias transtorácicas de massas ou lesões parenquimatosas. As principais alterações tomográficas associadas à presença de doença são: opacidades parenquimatosas confluentes, espessamento das paredes brônquicas, dilatação e agrupamento de brônquios, que leva a presença de bronquiectasias (Álvares, E. 2009; Capone, D. et al, 2006; Miller et al, 1999; Pina, J. 2000). A ecografia poderá detetar um derrame subpulmonar não visualizado num exame de raio x, para além de servir de método de orientação para a colocação de drenagens torácicas em derrames ou empiemas septados (Pina, J. 2000).

Quando surge o atingimento alveolar pelos bacilos, há uma resposta inicial inespecífica da qual participam os neutrófilos, macrófagos e linfócitos que constituem o foco inicial ou primário da infeção. Como a primeira tentativa de defesa não obtém êxito, os bacilos multiplicam-se e este processo inicial resulta em consolidação alveolar, que pode ser extensa, envolvendo parte ou a totalidade de um lóbulo alveolar. Esta progressão de infeção ocorre por via linfática atingindo os nódulos linfáticos regionais (mediastinais e/ou hilares). Através de um exame radiológico ou tomográfico, podemos visualizar a progressão linfática em direção ao hilo pulmonar e mediastino (Figura 7) (Álvares, E. 2009; Capone, D. et al, 2006).

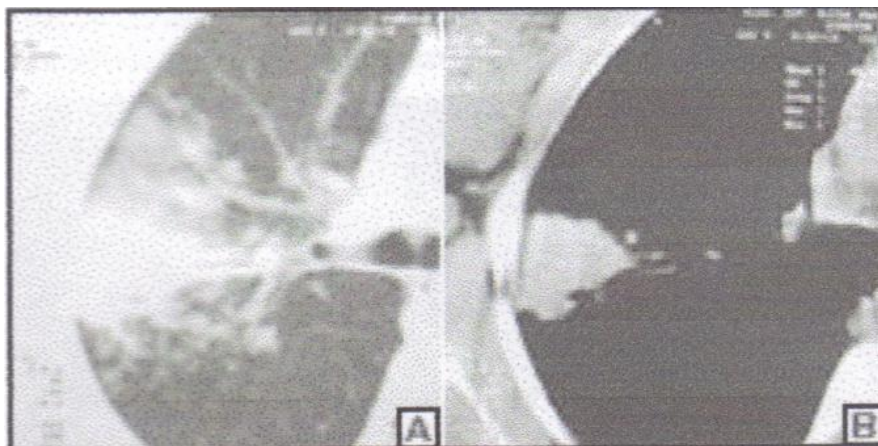


Figura 7 – Disseminação linfática. No lado A, tomografia registrada em janela de parênquima demonstra opacidades de limites imprecisos localizada no lobo superior direito, exibindo disseminação linfática local em direção ao hilo pulmonar, também visualizada na janela mediastinal (lado B).

A partir da primoinfeção, a progressão da doença pode acontecer em qualquer sentido, sendo várias as possibilidades por percurso sanguíneo de chegada dos bacilos. O sistema nervoso central (SNC), medula óssea, ossos, baço, fígado, rins e afins são alguns dos órgãos facilmente atingidos. Poucas semanas após a infecção iniciam-se os mecanismos específicos de defesa mediados pelos linfócitos T, os únicos capazes de diminuir a infecção e impedir a multiplicação bacilar. Os indivíduos que mantêm intactos os seus mecanismos de defesa conseguem manter os bacilos confinados em focos encapsulados, que por vezes podem calcificar, tanto nos nódulos linfáticos como no parênquima pulmonar (Figura 8) (Álvares, E. 2009; Capone, D. et al, 2006).

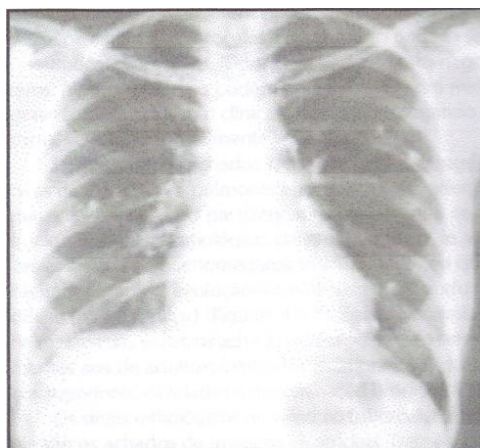


Figura 8 – Tuberculose residual. A radiografia revela múltiplos nódulos calcificados associados a nódulos linfáticos também calcificados no hilo esquerdo (Capone, D. et al, 2006)

O emprego da tomografia computadorizada do tórax é limitada, devido ao custo elevado do exame e à maior exposição de radiação ionizante que a radiografia simples (Capone, D. et al, 2006).

A TAC tem maior sensibilidade que o raio x ao tórax, e num contexto clínico e epidemiológico compatível, é um instrumento indispensável, capaz de demonstrar alterações muito sugestivas da doença, antes apenas acessíveis a patologistas. Por este motivo, a TAC tem sido cada vez mais utilizada no diagnóstico em fases precoces de tuberculose. Este exame deve ser solicitado aos pacientes cuja radiografia não apresente sinais de doença, assim como a doentes com sintomatologia que apresentam baciloscopias de amostras de esputo negativas para BAAR (Capone, D. et al, 2006).

A base do diagnóstico da tuberculose, como de qualquer outra doença infetocontagiosa, é a demonstração do agente etiológico que causa essa infeção. A baciloscopia das amostras obtidas por expectoração e as culturas em meios seletivos continuam a ser os métodos mais específicos no diagnóstico da doença. Porém, ao basearmos o diagnóstico apenas em técnicas bacteriológicas, impedimos uma rápida ação dos clínicos no tratamento do paciente, já que por vezes as baciloscopias ou não são realizadas, ou são negativas. Daí que os exames médicos de imagem sejam muito mais rápidos e eficazes (Capone, D. et al, 2006).

3.2. Diagnóstico laboratorial cultural

O diagnóstico definitivo de tuberculose é laboratorial e a identificação do *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) é realizada nas mais diversas amostras biológicas, tais como: esputo, secreções brônquicas, suco gástrico, líquido pleural, ascítico e pericárdico, líquido cefalorraquidiano (LCR), pús, urina, sangue e fezes (Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Miller, O. et al, 1999; Murray, P. et al, 2003; Pina, J. 2000). Como para qualquer exame microbiológico, a qualidade da amostra e transporte adequado ao laboratório são determinantes para o isolamento de micobactérias (Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Miller, O. et al, 1999; Murray, P. et al, 2003; Pina, J. 2000).

O tratamento laboratorial da amostra biológica inclui homogeneização/liquefação, descontaminação e concentração (Ferreira, W. et al, 2000).

A colheita deve ser sempre realizada antes de se iniciar a terapêutica antimicobacteriana, evitando a contaminação da flora microbiana adjacente. Um dos principais problemas no isolamento das micobactérias é a presença de outros microrganismos contaminantes que inibem o seu crescimento. Assim, todas as amostras que, a priori, são consideradas como potencialmente contaminadas com outras bactérias são submetidas a um processo de descontaminação/homogeneização antes de serem inoculadas em meios adequados ao crescimento das micobactérias. Existem vários métodos de descontaminação, sendo mais utilizado o método da N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio (NALC-NAOH), uma vez que se apresenta menos agressivo para as micobactérias. As amostras consideradas estéreis são apenas submetidas a um processo de centrifugação para concentração das micobactérias (Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Pina, J. 2000).

Devido ao elevado conteúdo lipídico em ácidos micólicos, a parede celular das micobactérias tem a capacidade de fixar determinados corantes e de resistir à descoloração após exposição subsequente a álcoois e ácidos. Esta característica, álcool-ácido resistência, permite uma coloração rápida das micobactérias em esfregaços realizados diretamente de amostras clínicas ou de concentrados por centrifugação e a sua observação direta ao microscópio (exame direto) (Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002).

O exame direto, realizado pelo método clássico de Ziehl-Neelsen (ZN) ou por fluorescência, é um exame fácil de realizar, mas de especificidade e sensibilidade moderadas, pois apenas permite afirmar ter-se encontrado microrganismos álcool-ácido resistentes (BAAR), uma das características fundamentais do agente da tuberculose (Pina, J. 2000; Ferreira, W. et al, 2000). Outras bactérias álcool-ácido resistentes, pelo seu conteúdo em ácidos micólicos, podem levar a falsos resultados positivos de tuberculose, tais como a *Nocardia*, o *Corynebacterium* e os *Rhodococcus*, que podem estar presentes em qualquer amostra clínica, principalmente nos pacientes imunodeprimidos (Mandell, G. et al, 2005; Pina, J. 2000).

Na coloração de ZN, uma das mais utilizadas, o bacilo da tuberculose apresenta-se como um bacilo fino, reto ou curvado, corado de vermelho, por vezes com coloração irregular, bipolar ou em rosário, isolado ou em grupos de bacilos paralelos (Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002).

O exame direto permite também avaliar a eficácia terapêutica antibacilar, com redução progressiva e negatificação das baciloscopias, em média, cerca de 6 a 8 semanas após início da antibioterapia (Pina, J. 2000).

O isolamento do MTC por cultura em meio sólido continua a ser o método de referência, permitindo a identificação posterior e respetivo teste de sensibilidade aos antibióticos. Apresenta como principal desvantagem o tempo necessário para se obter uma cultura positiva, já que cada ciclo de replicação das micobactérias dura cerca de 16 a 18 horas. O meio sólido mais utilizado é o meio de Lowenstein-Jensen (LJ), constituído essencialmente por ovo coagulado. Posteriormente foram criados os meios líquidos à base de gelose, tal como o meio de Middlebrook, transparente e que torna mais rápida a deteção das colónias (Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002).

Os sistemas automatizados para a deteção de micobactérias como o BACTEC 460 TB, BACTEC 9000 e o MGIT são promissores, pois utilizam meios enriquecidos que promovem a aceleração do crescimento bacteriano, mas podem também indicar resultados falsos positivos devido à contaminação por outras bactérias (Teixeira, H. et al, 2007).

A adição de antibióticos a estes meios originou os chamados meios seletivos, que podem ser bastantes úteis para amostras contaminadas, mas não devem ser utilizados isoladamente pelo risco de inibição do crescimento das próprias micobactérias. Os meios de cultura, depois de inoculados, são incubados a 37°C com atmosfera enriquecida em CO₂ durante cerca de 6 a 8 semanas. Quando se detetar macroscopicamente algum crescimento na superfície dos meios deve ser realizado um esfregaço para confirmação da presença de BAAR (Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002).

A CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) recomenda a utilização simultânea de um meio sólido e um meio líquido para cada amostra (Pina, J. 2000).

3.3. Diagnóstico serológico

3.3.1. I.G.R.A.

A estratégia para o controlo da tuberculose em Portugal, assim como nos outros países de baixa ou intermédia incidência, implica a implementação e expansão do diagnóstico e

tratamento da Infecção Tuberculosa Lactente (ITBL), sem prejuízo da prioridade do tratamento precoce e completo dos casos de tuberculose ativa. A ITBL não apresenta sintomas ou sinais da doença. O sistema imunitário mantém as bactérias quiescentes (em memória), contendo a sua multiplicação, impedindo o desenvolvimento de lesões orgânicas com significado patológico, não havendo portanto neste estadió da doença possibilidade de contágio (Lago, J. 2009; Mandell, G. et al, 2005).

O teste intradérmico à tuberculina (Figura 25) tem sido o único teste disponível para diagnosticar a infecção latente causada pelo MTC. No entanto, a ocorrência de falsos positivos devido a reacções cruzadas causadas pelo Bacilo de Calmette-Guérin (Vacinação BCG) torna este exame pouco específico.

Foram realizados estudos que permitiram a identificação de proteínas (ESAT-6 e CFP10) codificadas na região RD1 do genoma do MTC. Nos indivíduos com tuberculose latente as células T produzem interferão γ em resposta aos antígenos do MTC (Lago, J. 2009).

Recentemente surgiram no mercado novas técnicas, os “Interferon Gamma Release Assays” (IGRA), que permitem analisar a resposta imunológica à infecção pelo MTC. Actualmente estão comercializadas por dois laboratórios, o QUANTIFERON®-TB Gold (Cellestis, Austrália) e o TB.Spot® (Oxford Immunotec, Grã-Bretanha) (Lago, J. 2009).

Estes testes baseiam-se na detecção do interferão-Gama (IFN- γ) produzido pelos linfócitos após estimulação com determinados péptidos que mimetizam proteínas presentes nas estirpes patogénicas do complexo do MTC, mas ausentes da estirpe BCG vacinal e da maioria das micobactérias não tuberculosas (MNT). Relativamente ao teste IGRA, este apresenta algumas vantagens, nomeadamente: uma interpretação mais reprodutível (positivo, negativo, indeterminado); não é afetado pela vacinação BCG, reduzindo-se os resultados falsos positivos; não afeta o resultado de testes posteriores; não apresenta reação cruzada com MNT; tem demonstrado maior especificidade, principalmente em doentes imunocomprometidos (Lago, J. 2009; Mandell, G. et al, 2005).

No entanto, por ser um teste de baixa sensibilidade, em doentes imunodeprimidos e crianças podem ocorrer resultados falsos negativos. A necessidade de equipamento e pessoal especializado para a realização do teste pode também tornar-se uma desvantagem da técnica.

Atualmente, e segundo a DGS, as principais diretrizes a nível mundial recomendam o uso do IGRA como teste complementar do teste tuberculínico. No Anexo 1 estão listadas as recomendações da DGS numa circular informativa de 2010, sobre os procedimentos e

interpretação de resultados da prova tuberculina e prescrição do teste IGRA em doentes para avaliação de tratamento da ITBL.

3.4. Diagnóstico Fenotípico

De acordo com as características fenotípicas, as micobactérias podem ser classificadas em quatro grupos com base em duas características:

1. Produção de pigmentos carotenoides;
2. Tempo de crescimento em meio de cultura: crescimento rápido se ocorrer em menos de 7 dias e crescimento lento se ocorrer por um período superior a 7 dias (Vranjac, 2005).

De acordo com o tempo de crescimento e produção de pigmentos, as micobactérias podem ser classificadas através da seguinte tabela:

Grupos	Pigmentação	Tempo de crescimento
Grupo I	Fotocromogêneas	Lento
Grupo II	Escotocromogêneas	Lento
Grupo III	Acromogêneas	Lento
Grupo IV	Produtoras ou não de pigmento	Rápido

Tabela 1 – Classificação das micobactérias de acordo com o tempo de crescimento e produção de pigmento, segundo Runyon, em 1959 (Ferreira et al, 2000; Vranjac, 2005)

O bacilo da tuberculose cresce lentamente a 37°C (4 a 6 semanas), apresentando em meio sólido, colónias eugónicas – esbranquiçadas e friáveis, de aspecto rugoso em couve-flor, caracterizando-se pela não produção de pigmento (não cromogénias) (Ferreira et al, 2000; Pina, J., 2000).

Os principais testes bioquímicos utilizados na identificação das micobactérias são:

- **Deteção da niacina**

Todas as micobactérias produzem niacina, a partir do ácido nicotínico, mas só algumas possuem as enzimas necessárias para convertê-la em niacina ribonucleótido. O MT não possui estas enzimas, acumulando a niacina no meio de cultura, que pode ser detetada quimicamente. As resistências aos antituberculosos podem tornar o MT “niacina negativo” (Marmion, P. et al, 1993; Pina, J., 2000).

- **Teste da catalase**

A maior parte das micobactérias, com exceção do MT resistente à isoniazida, produzem catalase, detetável pela produção de oxigénio a partir do peróxido de hidrogénio. A quantidade de catalase produzida e a sua estabilidade ao calor é variável para cada espécie de micobactérias. O MT caracteriza-se pela baixa produção de catalase e a inactivação da enzima a 68°C (Marmion, P. et al, 1993; Pina, J., 2000).

- **Teste da redução dos nitratos**

Apenas algumas espécies de micobactérias possuem nitrorredutases que reduzem os nitratos a nitritos, sendo o MT fortemente nitrato positivo (Marmion, P. et al, 1993; Pina, J., 2000).

- **Suscetibilidade ao TCH (hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico)**

A suscetibilidade ao TCH torna-se útil para diferenciar o MT do *Mycobacterium bovis*, dentro do complexo do *Mycobacterium tuberculosis*. O MT é resistente ao TCH, crescendo em meio de cultura com este inibidor, ao contrário do *Mycobacterium bovis*, que é sensível e o seu crescimento é inibido (Marmion, P. et al, 1993; Pina, J., 2000).

Como é evidente, a abordagem clássica do diagnóstico da tuberculose está hoje em dia ultrapassada pela necessidade de respostas mais rápidas por parte do laboratório, quer na obtenção de culturas positivas, quer na identificação da micobactéria ou na realização de testes de sensibilidade aos antituberculosos. Foi proposto pela *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) que apenas devem decorrer cerca de 28 dias entre a receção da amostra e o diagnóstico final, com identificação e teste de sensibilidade aos antituberculosos, o que se torna impossível através dos métodos convencionais (Ferreira et al, 2000; Pina, J., 2000).

3.5. Diagnóstico Molecular

Ensaaios que recorram à biologia molecular são uma mais-valia para o diagnóstico e rapidez de resultados na rotina laboratorial, nomeadamente pela sua sensibilidade e especificidade. No entanto, a sua maior desvantagem é o seu custo, o que por vezes dificulta a sua espontânea utilização (Mandell, G. et al, 2005; Pina, J. 2000).

As técnicas de biologia molecular como Sondas Nucleicas, PCR e RFLP permitem um diagnóstico de tuberculose em 24 horas. A RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorfism*) é uma técnica que permite identificar sequências particulares do DNA do

MT, sendo uma das mais sofisticadas ferramentas epidemiológicas, possibilitando inclusive seguir o trajeto da infecção de uma determinada estirpe de micobactérias (Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Pina, J. 2000; Reddington, K. et al, 2011; Rossetti, M. et al, 2002).

3.5.1. PCR- Polymerase Chain Reaction

É um método de amplificação enzimática de ácidos nucleicos. Consiste em utilizar de maneira repetitiva a atividade da DNA-polimerase para copiar a sequência de DNA a amplificar, baseando-se no recurso a nucleotídeos enquadrando a região a amplificar (Foy et al, 2001).

Cada ciclo de amplificação implica a desnaturação das sequências de DNA de cadeia dupla pelo calor, a hibridização específica das cadeias oligonucleotídicas e a extensão das cadeias hibridizadas graças à enzima *Thermusaquaticus*-polimerase (*Taq*-polimerase). O número de sequências de DNA amplificadas especificamente varia exponencialmente em relação ao número de ciclos (2^n após n ciclos) (Foy et al, 2001).

A PCR desenvolveu um processo que reproduz e amplifica ciclicamente uma sequência específica do DNA da bactéria presente na amostra, obtendo-se em poucas horas milhões de cópias da sequência original. Cada ciclo de PCR decorre em 3 fases: desnaturação do DNA, hibridização dos primers e extensão da cadeia. Na primeira fase, após extração do DNA da amostra, dá-se a desnaturação do DNA (separação das duas cadeias) a uma temperatura de 95°C. Posteriormente, a uma temperatura de 60°C, dois primers (sequências sintetizadas de oligonucleótidos) reconhecem e ligam-se às duas cadeias separadas de DNA. Na terceira fase, a 70°C, na presença de uma enzima, uma DNA polimerase, e de nucleótidos livres, faz-se a extensão das cadeias formando assim duas novas cadeias. As quatro cadeias resultantes servem de molde para o ciclo seguinte, levando a repetição dos ciclos a um crescimento exponencial do DNA obtendo-se em poucas horas milhões de cópias do DNA original (Pina, J. 2000). A detecção do produto final é feita por hibridização com uma sonda marcada, após electroforese em gel de agarose e transferência para uma membrana de *nylon*. Vários fatores influenciam os resultados obtidos, tais como a complexidade e falta de padronização da técnica, a fácil contaminação entre amostras, presença de falsos positivos com DNA previamente amplificado, e presença de inibidores de amplificação presentes na própria amostra. A identificação molecular das micobactérias faz-se por PCR, através da amplificação e

sequenciação do gene 16S rRNA (Ferreira, W. et al, 2000; Ferreira, W. 2010; Forbes, B. et al, 1998; Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009; Guendouzi, S. et al, 2011; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Pina, J. 2000; Reddington, K. et al, 2011).

Posteriormente foram surgindo novas técnicas baseadas na PCR: a Amplicor e Cobas Amplicor (*Roche Molecular Systems*), LCR (*Ligase Chain Reaction da Roche*), SDA (*Strand Displacement Amplification da Becton Dickinson ProbeTec System*) amplificando o DNA e NASBA (*Nucleic acid sequence based amplification da Organon Tecnika*) e o MTD (*Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test*) que amplificam o rRNA (Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Pina, J. 2000; Rossetti, M., et al, 2002).

3.5.2. Sondas de DNA

A microscopia fornece informações importantes acerca da presença de doença por micobactérias mas não é capaz de identificar essas micobactérias. Por esse motivo têm sido desenvolvidas técnicas para detetar sequências específicas de DNA das micobactérias presentes nas amostras clínicas. Foram desenvolvidas técnicas de amplificação bacteriana (uma vez que o número de diferentes bactérias é reduzido), tais como reação em cadeia de polimerase, reação em cadeia da ligase, amplificação mediada por transcrição, amplificação e por deslocamento de fita. Estes procedimentos são utilizados especificamente para MT, embora relativamente insensíveis. A tendência é que a sensibilidade e capacidade discriminatória desta técnica melhorem e nos permitam substituir a microscopia (Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Lago, J. 2009; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Murray, P. et al, 2006; Pina, J. 2000).

Uma sonda de DNA não é mais do que uma sequência específica de DNA de cadeia única, complementar do ácido nucleico (DNA ou RNA) da bactéria em estudo e com o qual vai hibridizar. Atualmente as sondas mais utilizadas para a identificação das micobactérias são marcadas com éster de acridínio (AccuProbe System, da Gen-Probe), sendo o alvo da sonda o RNA ribossômico (rRNA) da micobactéria. A sonda, ao hibridizar com o rRNA, forma um complexo DNA-RNA estável, sendo a quantidade de quimioluminescência produzida proporcional à quantidade de sonda hibridizada e medida num luminómetro. Atualmente existem sondas para a identificação do MT, do complexo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium gordonae*, podendo as sondas serem utilizadas em culturas obtidas em

meio sólido ou líquido. Quando aplicadas em culturas, as sondas apresentam um elevado nível de exactidão e especificidade, não apresentando sensibilidade para serem utilizadas diretamente na amostra (Ferreira, W. et al, 2000; Ferreira, W. 2010; Forbes, B. et al, 1998; Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003; Pina, J. 2000).

As vantagens das sondas de DNA são a sua elevada especificidade e a capacidade de permitir um resultado entre 2 a 6 horas. As principais desvantagens são a sua baixa sensibilidade (pois só podem ser aplicadas à cultura pura e não diretamente à amostra), serem bastante dispendiosas, e disponíveis apenas para um número limitado de espécies (Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009; Mandell, G. et al, 2005; Murray, P. et al, 2003).

4. QUIMIOPROFILAXIA

Segundo os princípios gerais de antibioterapia que constam das orientações da Direcção Geral de Saúde (DGS) em 2011, os antibióticos representam um dos maiores avanços na história da medicina, com um impacto significativo na diminuição da mortalidade prematura e no aumento da esperança média de vida das populações. A antibioterapia é o tratamento da etiologia das infeções bacterianas pela utilização de antibióticos. Os antibióticos são apenas eficazes contra as bactérias. O uso desnecessário ou prolongado de antibióticos é o principal fator responsável pela crescente emergência de microrganismos resistentes que, a prazo, poderá pôr em causa a sua eficácia e utilidade. A prescrição antibiótica deve ser sempre considerada um ato médico de terapêutica, com riscos associados, e cuidadosamente ponderada em termos de risco-benefício.

Os objetivos do tratamento são a cura do doente, uma diminuição da transmissão da doença a indivíduos saudáveis, diminuição dos insucessos terapêuticos, evitar recidivas, impedir o desenvolvimento de resistências, prevenir aparecimento de sequelas e morte (Arbex, M. 2010; Rossetti, M. et al, 2002).

4.1. Antibióticos antituberculosos

A lepra e a tuberculose, as principais micobacterioses no homem, causadas respetivamente por *Mycobacterium leprae* e por *Mycobacterium tuberculosis*, requerem um longo tratamento com vários antibióticos associados, sendo por isso necessária uma forte adesão por parte do doente no sentido de evitar falhas no tratamento que podem levar ao aparecimento de multirresistências aos antibióticos. De salientar que muitas vezes o doente abandona o tratamento devido à elevada toxicidade dos mesmos (Jawetz et al, 2005; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

O comportamento das diferentes espécies face aos tratamentos com antibióticos não é uniforme, o que revela ser de enorme importância a identificação da estirpe e avaliação das resistências *in vitro*. O surgimento de métodos laboratoriais mais rápidos e eficazes, como a biologia molecular, na identificação da espécie e deteção de genes de resistência revelou-se decisivo no eficaz tratamento da tuberculose (Sousa, J. 2006).

De acordo com a eficácia terapêutica e grau de toxicidade, os tuberculostáticos têm sido classificados em dois grupos:

- Os antibióticos de primeira linha, que são mais potentes e com toxicidade aceitável, tais como rifampicina, isoniazida, etambutol, pirazinamida e estreptomicina;
- Os de segunda linha, que são menos potentes, tais como PAS (p-aminossalicilato), amicacina, capreomicina, ofloxacina, ciprofloxacina, D-cicloserina, etionamida e canamicina (Sousa, J. 2006).

Os antibióticos que melhor atuam em populações de micobactérias extracelulares são a isoniazida e a rifampicina, sendo que a rifampicina e pirazinamida têm maior efeito bactericida contra as células do interior dos macrófagos e das lesões caseosas fechadas (Jawetz et al, 2005; Sousa, J. 2006).

A maioria dos pacientes pode ser tratada com sucesso com antibióticos de 1ª linha em 6 meses, sendo nos primeiros 2 meses utilizada a associação isoniazida+rifampicina+pirazinamida, e nos restantes 4 meses a associação isoniazida+rifampicina. Apesar de este esquema ser utilizado em adultos e crianças, nas grávidas, devido ao elevado grau de hepatotoxicidade, é necessário incluir a administração de piridoxina (vitamina B6) para minimizar as reações adversas (Jawetz et al, 2005; Sousa, J. 2006).

Normalmente só se recorrem a antibióticos de 2ª linha quando surgem estirpes multirresistentes à rifampicina e isoniazida. Aos doentes com SIDA devem ser administrados quatro fármacos, tais como isoniazida+rifampicina+pirazinamida+etambutol ou estreptomicina (Jawetz et al, 2005; Sousa, J. 2006).

O tratamento prolongado da tuberculose veio pôr em evidência os efeitos adversos dos fármacos antituberculosos, denotados principalmente em doentes imunodeprimidos, tais como doentes com SIDA (Sousa, J. 2006). Nestes casos também se torna de elevada importância a coadministração de fármacos, como por exemplo o uso de antivirais inibidores das proteases, levando a que a rifampicina não seja de todo aconselhada. Isto porque a rifampicina é um forte indutor das enzimas hepáticas citocromo P₄₅₀, o que faz aumentar a metabolização hepática do antiviral e consequentemente diminuição da sua concentração sérica (Sousa, J. 2006). Outro exemplo de interações medicamentosas é o caso dos antibióticos indutores do citocromo P₄₅₀ que aumentam a esterificação dos estrogénios e a sua eliminação por via hepatobiliar, o que leva a terapia com rifampicina a diminuir a eficácia dos contraceptivos orais (Sousa, J. 2006).

O tratamento da tuberculose não é feito normalmente por recurso a antibióticos antibacterianos caracteristicamente utilizados noutras infeções, devido ao facto de as células do *Mycobacterium spp* terem uma parede celular (PC) diferente das bactérias pertencentes a outros Géneros, e apresentarem um crescimento fastidioso, assim como serem parasitas intracelulares (Sousa, J. 2006).

Proteínas de elevado peso molecular intercalam-se na PC funcionando como canais de porina que constituem 15% do seu peso. Os canais de porina permitem a difusão de compostos hidrófilos para o interior da célula. No entanto, este tende a excluir compostos aniónicos, por baixa permeabilidade da PC, daí serem descritas resistências de algumas micobactérias aos β -lactâmicos aniónicos e a outras moléculas aniónicas. As moléculas hidrofílicas de antibióticos β -lactâmicos e os antituberculosos isoniazida, pirazinamida, PAS, entre outros, sem carga eléctrica difundem bem através da PC das micobactérias por via hidrofílica (Sousa, J. 2006).

Os antibióticos lipofílicos, com elevado coeficiente de partilha, como por exemplo a rifampicina e clofazimida, difundem através da PC por via hidrófoba, ou seja, por difusão através da matriz lipídica da PC. Quanto maior for a lipofilia maior será o poder de difusão através da PC, por via lipófila. Daí que derivados mais lipófilos têm mais atividade contra as micobactérias (Sousa, J. 2006).

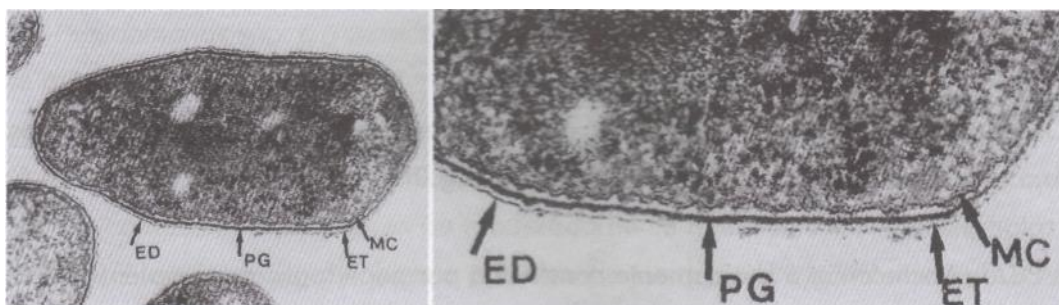


Figura 9 – Células de MTC visualizadas por microscopia eletrónica.

PG-peptidoglicano; ET-arabinogalactam; ED-ácidos micólicos/glicolípidos; MC-membrana citoplasmática; (Sousa, J. 2006; Ferreira, W. 2010)

Os agentes antituberculosos hidrofílicos (isoniazida, pirazinamida, PAS, D-cicloserina e talvez dapsona) difundem predominantemente através dos canais aquosos de porina existentes na PC das micobactérias (Sousa, J. 2006). A adição de cadeias alifáticas (hidrocarbonetos) longas à molécula de ciprofloxacina na posição torna-a mais hidrófoba proporcionando uma maior eficácia contra o *Mycobacterium tuberculosis* e

Mycobacterium avium (Sousa, J. 2006). A isoniazida, sendo uma molécula mais hidrofílica, e que utiliza esta via para penetrar na PC, após a adição de hidrocarbonetos de cadeia longa torna-se mais lipófila, e este fator aumenta a sua eficácia, daí a importância da via lipídica nas micobactérias (Sousa, J. 2006). Os aminoglicosídeos (moléculas policatiónicas) ligam-se às cabeças polares carregadas negativamente dos fosfolípidos, sulfolípidos e glicolípidos ácidos existentes na parede celular das micobactérias e permeiam a PC.

4.2. Suscetibilidade aos antibióticos

O PNCI (Programa Nacional de Controlo da Infecção), em 2004, recomendou a execução de testes de suscetibilidade aos antibióticos para as bactérias responsáveis por um processo infeccioso no paciente, do qual não se tenha conhecimento da sua identificação ou o antibiótico a aplicar. Ao necessitar de uma terapêutica antimicrobiana, torna urgente que as provas de suscetibilidade sejam executadas na maior brevidade, para que o antibiótico selecionado seja o mais indicado para combater o microrganismo causador da infecção. No caso em que a infecção seja causada por um microrganismo cuja suscetibilidade a alguns antimicrobianos seja conhecida e o doente seja alérgico, a este ou a algum dos seus componentes, devem ser testados novos fármacos.

Os fármacos antimicobacterianos, em função da sua atividade sobre o MT, são classificados da seguinte forma:

- **Fármacos com atividade bacteriana precoce:** induzem um rápido declínio do número de bacilos vivos no início do tratamento, reduzindo rapidamente a carga bacilar do doente e negatizando o exame direto do esputo, ao fim de 2 a 3 semanas de tratamento. Os fármacos com maior potência bactericida são a isoniazida e a estreptomicina, seguidos da rifampicina e etambutol;
- **Fármacos com atividade esterilizante:** têm a capacidade de eliminar todos os bacilos e reduzem as taxas de recidiva. Neste grupo os fármacos mais potentes são a pirazinamida e a rifampicina, sendo a isoniazida mais fraca. A estreptomicina e o etambutol são desprovidos desta atividade;
- **Fármacos com capacidade de prevenção de resistências:** evitam a emergência de mutantes resistentes. Esta capacidade é normalmente demonstrada pela isoniazida e rifampicina seguido pelo etambutol e estreptomicina. A pirazinamida é pouco eficaz na prevenção de resistências.

Um esquema terapêutico correto obrigará sempre à utilização múltipla de fármacos antimicobacterianos, de tal modo que as três atividades supracitadas estejam presentes em simultâneo. Na prescrição de antibioterapia antimicobacteriana, o clínico deverá ter sempre em consideração a função renal e hepática do doente (Pina, J. 2000).

Paciente Duração tratamento	Adultos	Crianças	Grávidas	HIV +
2 meses	Isoniazida Rifampicina Pirazinamida	Isoniazida Rifampicina Pirazinamida	Isoniazida Rifampicina Pirazinamida Piridoxina* (Vitamina B6)	Isoniazida Rifampicina Pirazinamida Etambutol ou Estreptomicina
4 meses	Isoniazida Rifampicina	Isoniazida Rifampicina	Isoniazida Rifampicina Piridoxina* (Vitamina B6)	

Tabela 2 – Esquema terapêutico da tuberculose, segundo normas da OMS.

*A piridoxina diminui nas grávidas os efeitos adversos dos fármacos antituberculosos.

Isoniazida: 5mg/kg/dia até 300mg/dia; Rifampicina: 10mg/kg/dia até 450mg/kg se peso <50kg. Se peso >50kg, 600mg/kg/dia; Pirazinamida: 30mg/kg/dia até 1500mg/kg/dia se peso >50kg. Se peso >50kg 2000mg/kg/dia; Etambutol: 25mg/kg/dia; Estreptomicina: 15mg/kg/dia até 700mg/kg/dia se peso <50kg. Se peso >50 kg 1000mg/kg/dia. (Álvares, E. 2009; Mandell, G. et al, 2005).

Após alguns estudos, constatou-se que determinadas doenças estavam associadas a determinados agentes infecciosos específicos, agentes esses que se não fossem combatidos poderiam levar ao surgimento de epidemias e consequentemente elevadas taxas de mortalidade, pelo que se tornou primordial tentar criar compostos capazes de combater esses agentes, nomeadamente os chamados antibióticos.

A descoberta dos antibióticos e a sua utilização no tratamento de doenças infecciosas revela-se um dos maiores avanços da Medicina no século XX (Sousa, J. 2006).

No entanto, esta descoberta, em que a utilização dos antibióticos no tratamento de determinadas doenças se tornou uma prática comum, levou ao surgimento de novos problemas, como o aumento das multirresistências das estirpes, nomeadamente em ambiente hospitalar, o que veio limitar as opções terapêuticas dos clínicos.

Os antibióticos dirigidos contra as bactérias devem ter um tropismo para a célula bacteriana sem que tenham qualquer efeito deletério sobre o Homem e sobre os outros microrganismos, explorando as diferenças entre procariotas e eucariotas (Sousa, J. 2006).

Na terapêutica de doenças bacterianas devem ser utilizadas moléculas que aliam a sua atividade antibacteriana a uma baixa toxicidade, ou seja, substâncias com um bom índice terapêutico (Sousa, J. 2006).

Os antibacterianos têm um tropismo para a célula procariota, interagindo com os respetivos alvos e exercendo a sua atividade de duas formas:

- **Bacteriostática:** inibe o crescimento bacteriano, sendo a morte celular provocada pelo sistema imune do hospedeiro;
- **Bactericida:** mata a célula bacteriana, podendo ocorrer bacteriolise (Sousa, J. 2006).

4.3. Mecanismos de resistência a antimicrobianos

Em 2006, a OMS divulgou um conjunto de *guidelines* para ajudar os clínicos na abordagem e tratamento da tuberculose multirresistente (WHO, 2006). Segundo a OMS, o tratamento da tuberculose multirresistente pode ser classificado como estandardizado ou individualizado. Os esquemas estandardizados baseiam-se em dados epidemiológicos sobre os padrões locais de resistência aos antituberculosos para determinada região. Os esquemas individualizados, mais específicos, baseiam-se na história prévia de tratamento antituberculose do doente e nos resultados do TSA (teste de sensibilidade aos antimicrobianos) do mesmo. A opção por uma destas estratégias deve basear-se na disponibilidade dos TSA de 1ª e 2ª linha, na existência de dados clínico-epidemiológicos sobre a prevalência de resistências na região, na história prévia de exposição a antituberculosos, bem como na garantia de acesso aos fármacos de 2ª linha. Na possibilidade de ser realizado um esquema individualizado, este deve ser optado, na medida em que ao evitar a exposição dos doentes a esquemas terapêuticos tóxicos e dispendiosos aos quais o paciente é resistente, constitui a forma mais fiável de se evitar a aquisição e disseminação de estirpes resistentes (Rich, L. 2006).

O tratamento da tuberculose requer uma terapia durante vários meses. O aparecimento e propagação de tuberculose multirresistente (MDR-TB) é o maior problema médico e de

saúde a nível mundial. A MDR-TB (Multi Drug Resistance – Tuberculosis) está definida como a tuberculose que é pelo menos resistente à rifampicina e isoniazida, as duas drogas de 1ª linha antituberculosa mais importantes (WHO, 2010; Guendouzi, S. et al, 2011). Enquanto o MDR-TB não é confirmado, o uso inadequado e consequentemente ineficaz de antibióticos pode conduzir a uma propagação da bactéria resistente e à amplificação da sua resistência. Deste modo, um diagnóstico rápido e uma identificação de MDR-TB são um pré-requisito para um tratamento adequado (Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Méndez, A. et al, 2002; Nagaraja, S. et al, 2011; Rossetti, M. et al, 2002).

A resistência aos agentes antimicrobianos adquirida resulta de processos bioquímicos codificados por genes bacterianos que podem ser devidos a mutações de genes da célula, aquisição de genes de resistência exógenos e mutação de genes adquiridos (Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009).

Todos os antibióticos têm alvos, normalmente proteínas, com responsabilidades funcionais ao nível do crescimento e manutenção celulares. Na mutação de genes celulares, essas proteínas são codificadas por genes celulares e as interações entre antibióticos e proteínas-alvo são por norma específicas. A mudança de um único aminoácido frequentemente resulta na alteração de uma base no gene que pode alterar as interações (Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009).

O progresso na compreensão dos mecanismos de resistência aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose tem permitido o desenvolvimento de novos métodos para a deteção da tuberculose resistente. A resistência aos fármacos apresenta-se como uma ameaça para os programas de controlo de tuberculose. Os estudos moleculares de mecanismos de ação de fármacos antituberculose têm elucidado as bases genéticas da resistência aos fármacos. Os mecanismos de resistência aos fármacos na tuberculose são causados por mutações cromossomais em diferentes genes da bactéria. Durante a exposição aos fármacos, há uma pressão seletiva favorecendo o desenvolvimento de linhagens resistentes. A tuberculose multirresistente é um problema mundial que origina sérias dificuldades para o controlo global da doença (Guendouzi, S. et al, 2011; Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009; Rossetti, M. et al, 2002).

O aumento do número de linhagens MDR-TB tem causado enorme preocupação, pois contribui para um aumento do número de mortes por tuberculose, estando frequentemente associada à infeção pelo HIV (Figura 10) (Guendouzi, S. et al, 2011; Méndez, A. et al, 2002; Lorent, N. et al, 2011).

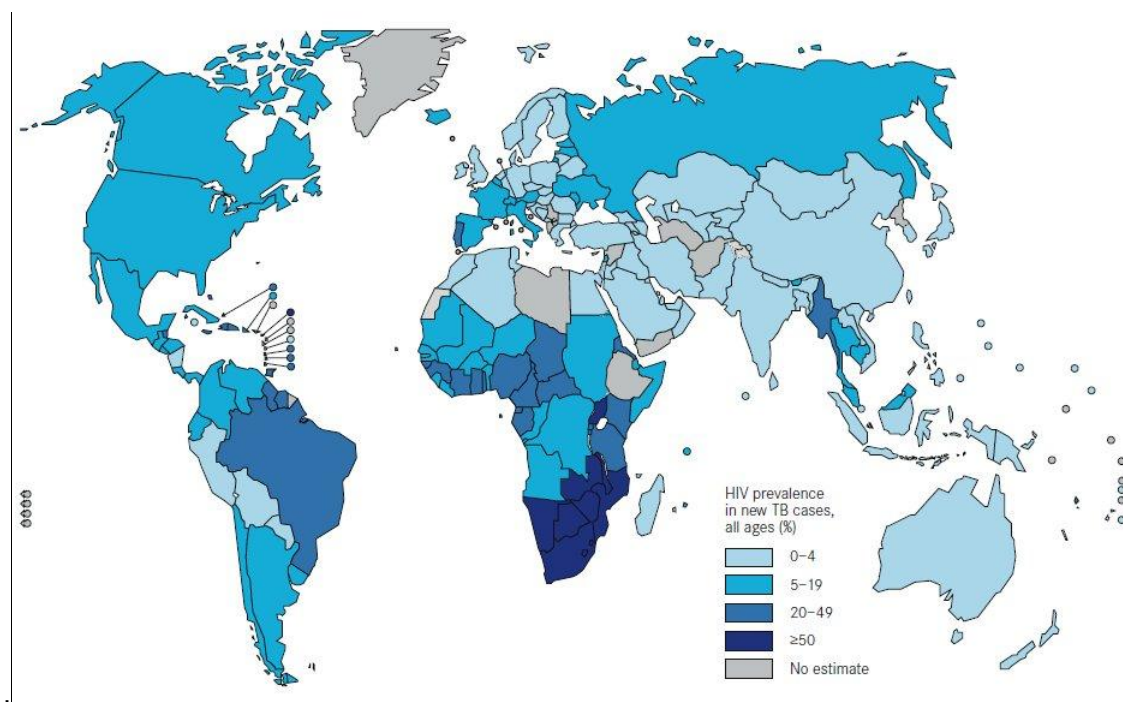


Figura 10 – Prevalência de casos de pacientes HIV positivos em novos casos de tuberculose, em 2010, segundo a OMS.

Em 2006, surgiram 9,2 milhões de novos casos de tuberculose pulmonar, dos quais 700.000 casos e 200.000 mortes ocorreram em pessoas infectadas com HIV. A maior parte dessas mortes ocorreram nos países em desenvolvimento, tendo mais de metade ocorrido no continente asiático (WHO, 2008).

As micobactérias são caracterizadas por uma membrana celular altamente hidrofílica que atua como uma barreira de permeabilidade para muitos componentes e possui um sistema de efluxo de fármacos bem desenvolvido. A micobactéria também produz enzimas hidrolíticas ou fármaco-modificadoras como β -lactamases e aminoglicosídeos acetil-transferases.

Análises genéticas e moleculares de bacilos resistentes sugerem que, por alterações na micobactéria, a resistência é adquirida ao fármaco como consequência de mutações no gene que codifica essa micobactéria. Durante a exposição ao MT existe uma pressão selectiva para mutantes resistentes. As linhagens MDR surgem após uma sequência de mutações nos diferentes genes envolvidos com cada um dos fármacos.

Os avanços em biologia molecular tornaram possível investigar os mecanismos genéticos de resistência aos fármacos, bem como caracterizar as mutações relacionadas à resistência aos diversos fármacos.

Outras formas de multirresistência à tuberculose são os XDR-TB (Extensively Drug-Resistance - Tuberculosis), resistência extensiva às drogas antituberculosas. Estas são causadas pela multirresistência MDR-TB como à rifampicina e isoniazida, mas com a agravante de ser também resistente a pelo menos um dos 3 antibióticos de 2ª linha injetáveis (capreomicina, canamicina ou amicacina) com associação à resistência a uma fluoroquinolona. É considerada a forma mais grave da doença. A XDR-TB necessita de um investimento imediato na gestão dos cuidados de saúde e nos programas de controlo de tuberculose. É também de extrema importância a prevenção com desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e tratamento, assim como a criação de vacinas eficazes (Álvares, E. 2009; Guendouzi, S. et al, 2011).

As tuberculoses multirresistentes podem também surgir por não-adesão ou abandono aos tratamentos, más condições sócioeconómicas, distúrbios emocionais e comportamentais, baixo nível educacional, toxicodependência com fatores de risco associados, alcoolismo, imigrantes e desalojados (Álvares, E. 2009; Guendouzi, S. et al, 2011; Mandell, G. et al, 2005; Méndez, A. et al, 2002).

4.4. Antibióticos de 1ª linha e resistências associadas

4.4.1. Rifampicina

É um dos derivados semi-sintéticos da rifamicina B (Figura 11), sendo esta produzida por *Amycolatopsis mediterranei*, tendo sido descoberta em 1965. É também conhecida por rifampim (Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

É utilizada no tratamento da infeção tuberculosa pulmonar e extrapulmonar, em associação com outros antituberculosos (Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

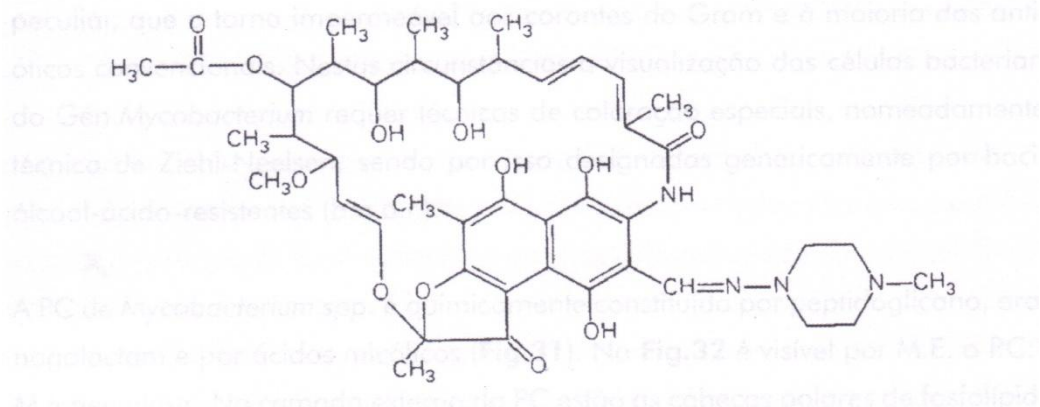


Figura 11 – Estrutura química da rifampicina (Sousa, J. 2006).

A rifampicina inibe a transcrição nas células bacterianas susceptíveis. Esta inibe a RNA polimerase, não ocorrendo portanto a síntese de mRNA à custa da fibra do DNA. A rifampicina liga-se à subunidade β do holoenzima $\alpha_2 \beta \beta' \sigma$ (RNA polimerase) ou à subunidade reconstituída $\alpha_2 \beta$, funcionando portanto a subunidade β como alvo da rifampicina, apresentando um efeito bactericida (Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

A RNA polimerase requer um molde de DNA, quatro 5'-trifosfato ribonucleosídeos (ATP, GTP, CTP e UDP) e Mg^{++} e liga-se a um local específico do DNA, a região promotora, promovendo a síntese de mRNA (transcrição). A rifampicina, ao associar-se à subunidade β da enzima, aborta a transcrição (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

A rifampicina inibe a transcrição nas células eucarióticas. Para isso, são necessárias altas concentrações, o que em doses terapêuticas anti-bacterianas não afetará as células do Homem. No entanto, a síntese de mRNA nas mitocôndrias pode ser inibida pela rifampicina, mas a concentração requerida é cem vezes superior que a necessária para obter o mesmo efeito nas células bacterianas susceptíveis (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006; Shlaes, D. et al, 1997).

Este antibacteriano é ativo contra MT. É evidente que, dado a lipofilia e o PM da rifampicina, e a impermeabilização da membrana externa à rifampicina, justifica-se que este antibiótico não tenha grande atividade contra bactérias de Gram negativo (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

A resistência do MT à rifampicina tem sido associada a mutações de uma região de 69bp do gene *rpoB*. As mutações ocorrem por deleção, por inserção e mais frequentemente por modificação num único par de bases. Isto leva a que a resistência à rifampicina,

quando usada em monoterapia, possa acontecer rapidamente, e que se aconselhe a sua utilização terapêutica em associação com outros antibióticos (Cui, Z. et al, 2011; Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

A rifampicina é muito bem absorvida por via oral, havendo cointeração com a ingestão de alimentos e PAS. Atinge o seu pico sérico após 2 a 3 horas da sua ingestão oral. Distribui-se bem nos tecidos e fluidos do organismo, tais como LCR, líquido pleural, ossos, abscessos, fluido ocular, líquido amniótico (atravessa a barreira placentária) e fígado. Este atinge boas concentrações intracitoplasmáticas nos fagócitos, dada a lipofilia da molécula, o que justifica a sua elevada e rápida atividade bactericida (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

É um fármaco de metabolização hepática, onde sofre desacetilação, sendo a forma inalterada e metabolizada eliminada por via biliar e a forma alterada novamente reabsorvida fazendo a circulação enterohepática. Só uma pequena fração é eliminada por via renal, o que justifica que pacientes com insuficiência renal não necessitam de acertos de dose, ao contrário dos pacientes que apresentam insuficiência hepática (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

A rifampicina é um forte indutor do citocromo P₄₅₀ pelo que faz baixar a concentração sérica de outros fármacos de metabolização hepática coadministrados. Este fármaco confere uma cor alaranjada à urina, saliva, lágrimas, expectoração e suor, pelo que pode ser removido do organismo por hemodiálise e diálise peritoneal (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

Nos doentes com SIDA, a administração de antivirais inibidores das proteases e rifampicina não é recomendada, uma vez que esta faz diminuir a sua concentração sérica. A rifabutina (derivado da rifampicina) também induz o citocromo P₄₅₀, mas apenas com metade da atividade da rifampicina, o que, não sendo tão evidentes os efeitos indutores, leva a que seja mais aconselhado a doentes com SIDA. Algumas estirpes rifampicina-resistentes são rifabutina-sensíveis (Sousa, J. 2006).

4.4.2. Isoniazida

Surgiu em 1950 e trata-se de uma hidrazida do ácido isonicotónico obtida por síntese (Figura 12) e com uma estrutura relacionada com a vitamina nicotinamida (Mandell, G. et al, 2005; Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006). Apresenta uma ação

específica contra micobactérias, entre elas o MT, não exercendo qualquer atividade contra outras bactérias.

É indicada no tratamento de todas as formas clínicas de tuberculose, em associação com os outros antituberculosos de 1ª linha.

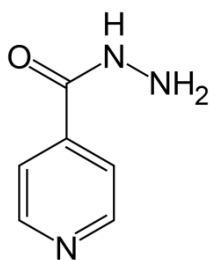


Figura 12 – Estrutura química da isoniazida (Sousa, J. 2006).

Possui uma ação bacteriostática contra os bacilos em repouso e bactericida contra os bacilos em divisão ativa. Atua contra os bacilos intracelulares nos fagócitos e nas lesões caseosas, onde o pH se apresenta ácido (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

Inicialmente esta atua na síntese dos ácidos micólicos, tratando-se portanto de um antibiótico antiparietal. Inibe a produção de ácidos gordos de cadeias longas, que são precursores dos ácidos micólicos, afetando a arquitetura da PC das micobactérias, o que justifica a sua atividade bactericida contra micobactérias em crescimento. O alvo é uma proteína redutase, produto do gene *InhA*, indispensável para a biossíntese dos ácidos micólicos. Esta liga-se covalentemente ao anel nicotinamida dos nucleótidos do gene *InhA*, bloqueando a sua expressão. A isoniazida comporta-se como uma pró-droga, pois na sua forma intacta não tem qualquer atividade, requerendo a sua biotransformação numa forma ativa. A enzima do MT catalase-peroxidase, produto do gene *KatG*, oxida a isoniazida a uma forma biologicamente ativa, o que demonstra a importância do gene *KatG* na ação da isoniazida (Cui, Z. et al, 2011; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

Vários estudos sugerem que as estirpes resistentes à isoniazida incorporam menor quantidade de antibiótico que as estirpes suscetíveis, em condições de baixa tensão em oxigénio. No entanto, em condições aeróbias, as micobactérias resistentes ou suscetíveis incorporam a mesma quantidade de antibiótico (Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

É de salientar que mutações nos genes *InhA* e *KatG* estão geralmente associadas à resistência das micobactérias à isoniazida (Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

A isoniazida é bem absorvida por via oral mas também utilizada por via intramuscular (Sousa, J. 2006). A sua absorção é ligeiramente dificultada pela coadministração de antiácidos contendo hidróxido de alumínio.

Difunde-se bem nos tecidos e fluidos, atingindo boas concentrações no LCR, nos líquidos pleurais, na placenta, na glândula mamária, nas lesões caseosas da tuberculose e no interior dos fagócitos. É acetilada no fígado pela ação de acetiltransferases, originando os metabolitos acetilisoniazida e ácido isonicotínico, sendo o fármaco inalterado e os metabolitos eliminados por via renal (Sousa, J. 2006). O teor de metabolização da isoniazida apresenta grande importância clínica, causando limitações terapêuticas e exacerbação na toxicidade do fármaco (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

Os efeitos adversos como a neuropatia periférica e a hepatotoxicidade ocorrem nos mais lentos acetiladores. A interação entre a isoniazida e a difenilhidantoína está relacionada com o polimorfismo da acetilação. A isoniazida é um inibidor do citocromo P₄₅₀ e aumenta a concentração sérica de fármacos de metabolização hepática coadministrados com a isoniazida. A razão acetilisoniazida/isoniazida livre na urina é maior nos rápidos acetiladores que nos pacientes lentos acetiladores. Os metabolitos são menos tóxicos e mais rapidamente eliminados. A dose a administrar é influenciada pelo estado de disfunção hepática dos pacientes. Este fármaco é removido por diálise peritoneal e por hemodiálise (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

4.4.3. Etambutol

Quimicamente é o N,N'-di-isopropiletilenodiamina (Figura 13). Somente o isómero dextrógiro de etambutol tem atividade contra o MT, apresentando uma menor capacidade esterilizante do que a rifampicina e isoniazida. Foi utilizado pela primeira vez em 1963 (Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

É um antibiótico antituberculoso com fraca atividade contra bacilos de crescimento lento, não sendo muito útil nos tratamentos curtos de tuberculose. É utilizado em concomitância com os outros antibióticos de 1ª linha no tratamento da tuberculose, sobretudo em doentes com SIDA (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

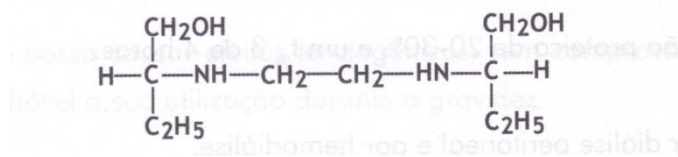


Figura 13 – Estrutura química do etambutol (Sousa, J. 2006).

Apresenta uma ação bacteriostática, sendo ativo contra bactérias em crescimento, e não tem efeito contra células não proliferantes. Este entra no interior bacilar por difusão passiva e tardiamente afeta várias funções celulares. Inibe a incorporação de ácidos micólicos na PC das micobactérias, inibindo também a incorporação da arabinose no arabinolactam da PC, admitindo-se que o etambutol inibe a enzima arabinosetransferase, codificada pela região *emb* constituída por 3 genes operão (2 genes *embA* e *embB* e um 3º gene regulador) (Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006). São consideradas que mutações pontuais no gene *embB* conferem resistência ao fármaco.

É bem absorvido por via oral, obtendo-se um pico sérico 2 a 4 horas após a sua administração. Difunde-se bem nos tecidos e atinge no LCR 10% a 15% da concentração sérica. De igual forma, também atravessa a barreira placentária, parênquima pulmonar e a parede das lesões caseosas. Uma pequena fração sofre metabolização hepática originando aldeído que é subsequentemente oxidado a ácido dicarboxílico. Os metabolitos e o fármaco metabolizado são eliminados por via renal (filtração e secreção tubular). Este é removido por hemodiálise e diálise peritoneal (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

4.4.4. Pirazinamida

É um análogo da pirazina da nicotinamida (Figura 14) e utilizado como antituberculoso de 1ª linha no tratamento das infeções por MT, particularmente ativo contra formas intracelulares em associação com outros antituberculosos. Atua apenas em meio ácido, tendo pouca ou nenhuma atividade a pH 7. Foi descoberta em 1952 (Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

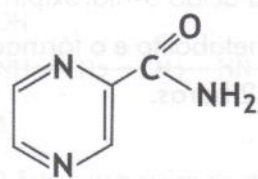


Figura 14 – Estrutura química da pirazinamida (Sousa, J. 2006).

É um antibiótico com ação bactericida, só manifestando a sua ação em meio ácido, como acontece no interior dos fagócitos e nas lesões caseosas. Tem maior atividade esterilizante contra microrganismos intracelulares que contra os extracelulares. Tal como a isoniazida, a pirazinamida comporta-se como uma pró-droga, sendo no interior do bacilo desaminada a ácido pirazinoico, graças à enzima bacilar pirazinamidase, codificada pelo gene *pncA* (Sousa, J. 2006). O ácido pirazinoico torna-se um metabolito tóxico para a bactéria (Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

Mutações no gene *pncA* conferem ao MT resistência à pirazinamida. O fármaco é bem absorvido por via oral, originando o pico sérico 2 horas após a sua ingestão. Distribui-se bem nas meninges inflamadas, atingindo no LCR concentrações terapêuticas, sendo por isso recomendado na meningite tuberculosa. Atinge também boa concentração no interior dos fagócitos. Os metabolitos do ácido pirazinoico e o fármaco inalterado são eliminados por via renal (Pina, J. 2000; Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006).

4.4.5. Estreptomicina

Foi, em 1944, o primeiro antibiótico a ser utilizado no tratamento de tuberculose (Arbex et al, 2010; Mandell, G. et al, 2005; Sousa, J. 2006).

A estreptomicina é um antibiótico aminoglicosídeo-aminociclitol (Figura 15). A estreptomicina é ativa contra bacilos gram negativos aeróbios/anaeróbios facultativos, não apresentando qualquer atividade contra bactérias anaeróbias estritas (Rossetti, M. et al, 2002; Sousa, J. 2006). É utilizado, entre outros, para o tratamento da tuberculose, em associação com outros fármacos de 1ª linha de tratamento (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

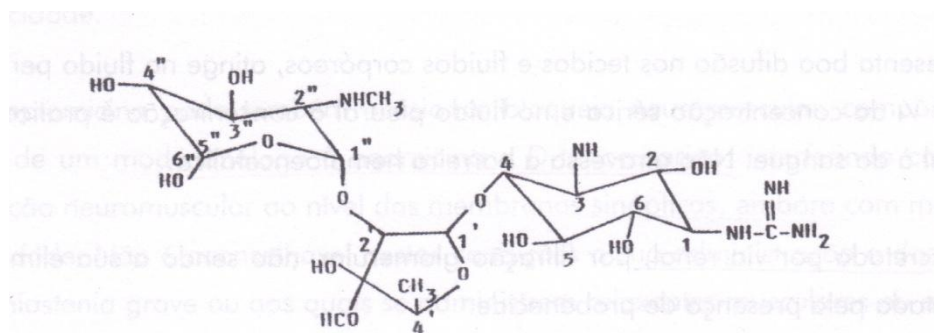


Figura 15 – Estrutura química da estreptomicina (Sousa, J. 2006).

Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica ao ligar-se de maneira irreversível à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, interferindo na integridade da membrana celular. A resistência surge por mutações do gene *rrs*, que codifica o 16S RNA ribossomal, e no gene *rpsL*, que codifica o gene da proteína ribossomal S12 (Arbex et al, 2010; Rossetti, M. et al, 2002).

Tal como os outros aminoglicosídeos, a estreptomicina não é absorvida no trato gastrointestinal, pelo que a sua administração é feita por via intramuscular (IM) (Sousa, J. 2006).

Apresenta uma boa difusão nos tecidos e fluidos corporais, não atravessando no entanto a barreira hematoencefálica. É um fármaco excretado por via renal, por filtração glomerular, sendo apenas uma pequena porção excretada pela biliar (Sousa, J. 2006).

Ao contrário dos restantes aminoglicosídeos, a estreptomicina apresenta baixa nefrotoxicidade (Sousa, J. 2006).

4.5. Antibióticos de 2ª linha

Segundo Arbex e seus colaboradores em 2010, num estudo de interações medicamentosas efectuado no Brasil, na última norma técnica publicada em outubro de 2009 e de acordo com literatura internacional, são considerados os portadores de tuberculose multirresistente os pacientes portadores de bacilos resistentes a isoniazida e rifampicina, ou aqueles que apresentam resistência à isoniazida, rifampicina e ainda outro fármaco de 1ª linha, ou mesmo quando existe falha do esquema terapêutico. Para estes casos foi proposto um esquema terapêutico de 2ª linha constituído por canamicina, PAS (ácido paraminosalicílico), amicacina, capreomicina, etionamida, D-cicloserina, ofloxacina, ciprofloxacina e linezolid (Álvares, E. 2009; Arbex et al, 2010; Pina, J. 2000; Sousa, J.

2006). Os antibióticos de 2ª linha são mais caros e apresentam maior toxicidade. São menos eficazes que os fármacos de 1ª linha, e requerem uma administração mais prolongada de cerca de 18 meses sob tratamento directamente observado (Álvares, E. 2009).

4.5.1. PAS (ácido paraminosalicílico)

É um antibiótico antimetabolito. Apresenta um mecanismo bacteriostático com ação específica sobre o MT. Este interfere na síntese do ácido fólico bacilar e por inibição da captação de ferro.

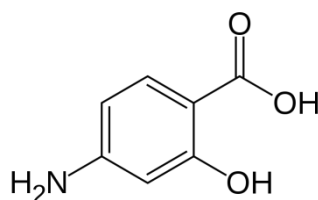


Figura 16 – Estrutura química do PAS.

É bem absorvido por via oral, atingindo-se o pico sérico 1 a 2 horas após a sua ingestão. É metabolizado no fígado por acetilação, sendo 85% dos metabolitos eliminados por via renal (Sousa, J. 2006; Arbex, et al, 2010). A sua administração prolongada pode diminuir a incorporação de iodo no organismo e causar hipertrofia da tiróide (Arbex et al, 2010; Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

4.5.2. Ciprofloxacina

Apresenta-se como uma 6-fluorquinolona e a introdução de um ciclo aminado (Figura 17) faz aumentar o espectro bacteriano desta molécula. Pertence ao grupo das quinolonas (de 2ª geração) e é utilizado com eficácia em pacientes infetados com MT multirresistente (Arbex et al, 2010; Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

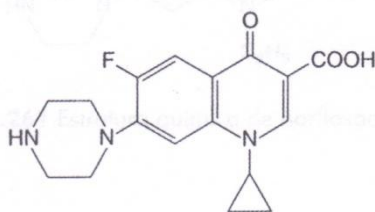


Figura 17 – Estrutura química da ciprofloxacina (Sousa, J. 2006).

As fluoroquinolonas são bactericidas. Estas inibem a atividade da DNA girase ou da topoisomerase II bacteriana, que regula a tipologia do DNA e é essencial à sobrevivência da bactéria. A DNA girase torna a molécula de DNA bacteriano compacta e biologicamente ativa. As extremidades livres do DNA induzem a síntese descontrolada do RNAm e de proteínas, assim como a produção de exonucleases e a degradação dos cromossomas. Estes factores levam à morte celular. Os três mecanismos principais que explicam a resistência a estes fármacos são: a mutação na enzima DNA girase, que passa a não sofrer a ação do antibiótico; alteração na membrana celular da bactéria, que se torna impermeável as Fluoroquinolonas, diminuindo a difusão do fármaco para o interior da célula; e a existência de um mecanismo de efluxo que retira o fármaco do interior da célula (Arbex et al, 2010; Pina, J. 2000).

É bem absorvida por via oral, podendo ser também administrada por via endovenosa. A sua concentração sérica é atingida cerca de 1 a 3 horas após a sua absorção oral. Esta não é afetada pela ingestão de alimentos mas diminuída com a coingestão de medicamentos contendo iões bi ou trivalentes (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

Difunde-se bem nos tecidos e fluidos corporais. Atinge altas concentrações intracelulares nos fagócitos, sendo indicada no tratamento de infecções por parasitas intracelulares. É fracamente removida por diálise peritoneal e por hemodiálise (Arbex et al, 2010; Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

4.5.3. Ofloxacina

Trata-se de uma 6-fluorquinolona da 2ª geração (Figura 18) e é uma mistura racémica de dois estereoisómeros, sendo o mais ativo a levofloxacina. É ativa contra bacilos de Gram negativo e tem uma ação moderada contra MT (Cui, Z. et al, 2011; Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

Pertence ao grupo das quinolonas e é utilizado com eficácia em pacientes infectados com MT multirresistente (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

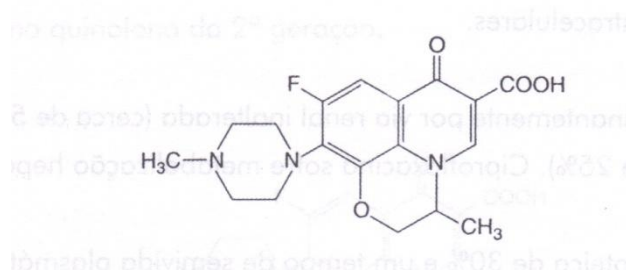


Figura 18 – Estrutura química da ofloxacin.

Apresenta uma boa absorção oral, não sendo afetada pela ingestão de alimentos. Penetra bem nos tecidos e fluidos do organismo, sendo eliminada por via renal, sendo a dose afetada nos pacientes com insuficiência renal (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

4.5.4. D-Cicloserina

É produzida por *Streptomyces orchidaceus*, *Streptomyces garyphalus* ou por síntese, sendo quimicamente o D-4-amino-3-isoxazolidona (Figura 19).

É um antibiótico inibidor da síntese do mucopeptídeo ou peptidoglicano, na fase citoplasmática. Isto obriga o antibiótico a permear a membrana celular (MC) e o transporte ativo da D-cicloserina requer a intervenção de permeases de aminoácidos, o que leva ao antibiótico alcançar no citoplasma bacteriano concentrações superiores à sua concentração no meio de cultura (Arbex et al, 2010; Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

Este antibiótico só é ativo contra células bacterianas em crescimento e em ambientes hipotónicos ocorre a lise celular. É ativo contra bactérias gram positivo e tem fraca atividade contra bactérias gram negativo. O seu baixo PM não impede a permeação na OM (membrana externa) pelo que se torna evidente o papel do coeficiente de partilha no espectro de atividade deste antibiótico. É um antibiótico ativo contra MT, só sendo normalmente utilizado após falha dos antibióticos de 1ª linha, ou em estirpes multirresistentes (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

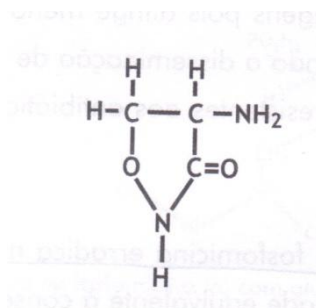


Figura 19 – Estrutura química da D-cicloserina.

Existem dois mecanismos de resistência à D-cicloserina, tais como a produção anormal de racemases ou sintetases, que os fazem escapar à ação inibidora da D-cicloserina. A D-cicloserina é facilmente absorvida no trato digestivo e apresenta uma boa penetração através dos tecidos e fluidos do organismo, atravessando a barreira hematoencefálica. É excretada por via renal, por filtração glomerular (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

4.5.5. Etionamida

Trata-se de um antibiótico de 2ª linha no tratamento da tuberculose desde 1956. É quimicamente derivado do ácido isonicotínico (Figura 20) e estruturalmente semelhante à isoniazida. É ativo contra estirpes de MT multirresistentes aos antibióticos de 1ª linha. (Arbex et al, 2010; Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

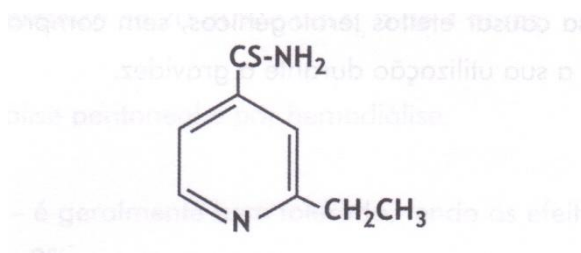


Figura 20 – Estrutura química da etionamida.

Actua por inibição da síntese dos ácidos micólicos com comprometimento da membrana celular bacteriana, demonstrando uma ação bactericida contra bacilos intracelulares e extracelulares. Algumas estirpes de MT exibem resistência cruzada entre a etionamida e a isoniazida. Mutações na região *inhA*, envolvida na biossíntese dos ácidos micólicos,

ocorrem nas estirpes etionamida-resistentes (Arbex et al, 2010; Mitnick, C. et al, 2009; Sousa, J. 2006).

É bem absorvido por via oral, obtendo-se o pico sérico 3 horas após a ingestão do fármaco. Apresenta uma boa difusão através dos tecidos, atingindo o sistema nervoso central (SNC). É fortemente metabolizado no fígado por sulfoxidação, N-metilação e desaminação, originando diversos metabolitos, eliminados por via renal (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

4.5.6. Canamicina

Foi sintetizada em 1957, e pertence ao grupo dos aminoglicosídeos-aminociclitolis que são utilizados como antibióticos secundários em doentes infetados com estirpes multirresistentes aos fármacos de 1ª linha, incluindo à estreptomicina. No entanto, é mais utilizado nomeadamente no tratamento de micobacterioses atípicas (Arbex et al, 2010; Sousa, J. 2006). Culturas de *Streptomyces kanamyceticus* elaboram um complexo de canamicina A, B e C tal como podemos visualizar na Figura 21.

Embora a canamicina B seja o composto com maior atividade antimicrobiana, a canamicina A é o produto utilizado na terapêutica, sob a forma de sulfato, dado a sua menor toxicidade (Sousa, J. 2006).

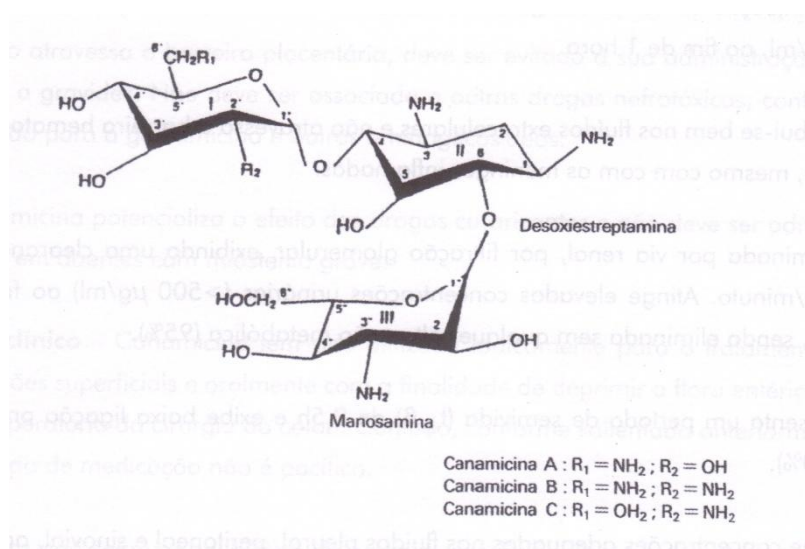


Figura 21 – Estrutura química da canamicina.

A canamicina é um bactericida contra bacilos de Gram negativo, sendo geralmente mais ativa que a estreptomicina e menos ativa que os restantes aminoglicosídeos (Sousa, J. 2006).

Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica ao ligar-se de maneira irreversível à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, interferindo na integridade da membrana celular. A resistência surge por mutações do gene *rrs*, que codifica o 16S RNA ribossomal, e no gene *rpsL*, que codifica o gene da proteína ribossomal S12 (Arbex et al, 2010; Pina, J. 2000).

É administrada por via parental (IM), uma vez que não é absorvida por via oral. Distribui-se bem nos fluidos extracelulares, como líquido pleural, peritoneal e sinovial, mas não atravessa a barreira hematoencefálica, mesmo com as meninges inflamadas. É eliminada por via renal, por filtração glomerular. Esta é removida por hemodiálise e diálise peritoneal.

Uma vez que atravessa a placenta, não deve ser utilizado durante a gravidez (Arbex et al, 2010; Sousa, J. 2006).

4.5.7. Amicacina

É um derivado semi-sintético da canamicina A. É produzida por acilação da molécula da canamicina A exibindo, em C₁ do anel aminociclitol, uma cadeia lateral 2-hidroxi-4-aminobutirilo (Figura 22).

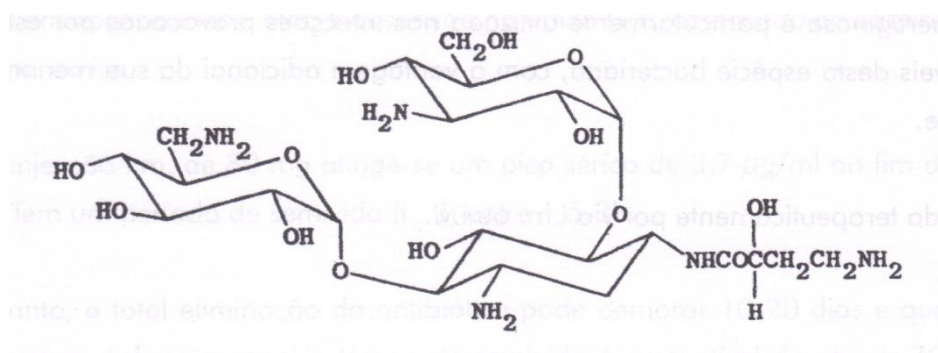


Figura 22 – Estrutura química da amicacina (Sousa, J. 2006)

Pertence ao grupo dos aminoglicosídeos-aminociclitolis e é utilizada como antibiótico secundário em doentes infetados com estirpes multirresistentes aos fármacos de 1ª linha (Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica ao ligar-se de maneira irreversível à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, interferindo na integridade da membrana celular. A resistência surge por mutações do gene *rrs*, que codifica o 16S RNA ribossomal, e no gene *rpsL*, que codifica o gene da proteína ribossomal S12 (Arbex et al, 2010).

Não é absorvida por via GI (gastrointestinal), sendo administrada por via IM (intramuscular), e difunde-se bem nos fluidos corporais e tecidos. Não atravessa a barreira hematoencefálica e deve ser usada a administração intratecal no tratamento das meningites por bacilos de Gram negativo, não sendo fácil a sua remoção do LCR. É eliminada por via renal, por filtração glomerular (Arbex et al, 2010; Sousa, J. 2006).

4.5.8. Capreomicina

São polipéptidos básicos idênticos aos aminoglicosídeos-aminociclitolis. Não sendo um antibiótico bem absorvido pela via oral é administrado por via IM.

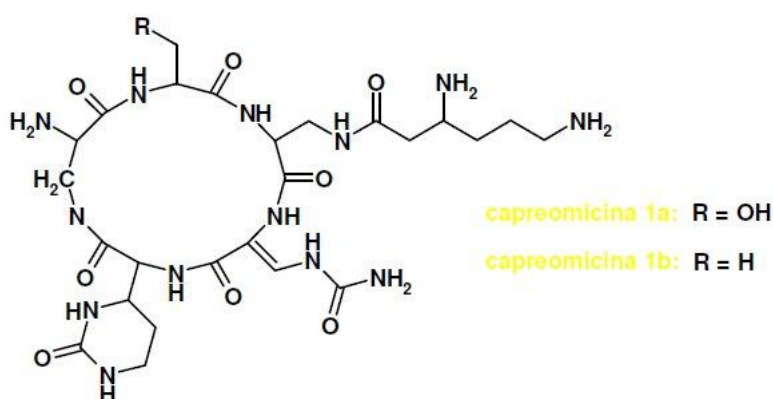


Figura 23 – Estrutura química da capreomicina.

São antibióticos inibidores da síntese proteica a nível da translocação, apresentando os mesmos efeitos secundários dos aminoglicosídeos (Arbex et al, 2010; Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006). Estes são utilizados em associação com outros antibióticos

antituberculosos no combate às estirpes de MTC multirresistentes aos antituberculosos de 1ª linha (Sousa, J. 2006). Normalmente é administrada por via intramuscular (Mitnick, C. et al, 2009).

4.5.9. Linezolide

Trata-se de um antibiótico que inibe a síntese de proteínas por um mecanismo particular e diferente dos restantes antibióticos, que interage com 23S rRNA. A linezolide pertence a um novo grupo de antibióticos, as oxazolidinonas (Figura 24). A sua atividade antibacteriana mostra-se importante no tratamento de infeções por *Staphylococcus spp*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium spp*, *Helicobacter pylori*, anaeróbios estritos e *Mycobacterium tuberculosis*. Este fármaco é utilizado na tuberculose apenas como alternativa aos antibióticos de 1 e 2ª linha, quando surgem as estirpes multirresistentes (Mitnick, C. et al, 2009; Sousa, J., 2006).

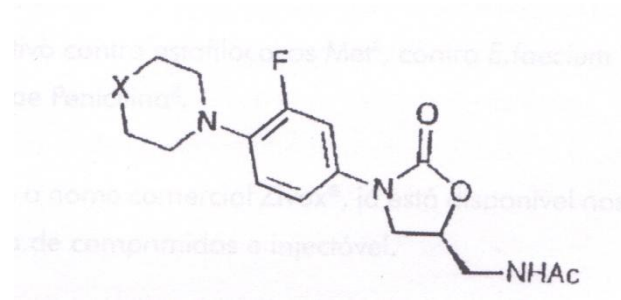


Figura 24 – Estrutura química do linezolide (Sousa, J. 2006)

Normalmente este fármaco é administrado aos doentes com tuberculose quando já não existem opções viáveis no tratamento. São vários os estudos que confirmam a eficácia do linezolide no tratamento da tuberculose, em particular no tratamento da XDR-TB, contudo em todos eles o linezolide é administrado em conjunto com outros antituberculosos, pelo que o seu real efeito no tratamento da tuberculose multirresistente não pode ser adequadamente estabelecido (Fortún, J. et al, 2005; Park, N. et al, 2006; Von der Lippe, B. et al, 2006). Porém, existem mesmo assim algumas evidências que sugerem que o linezolide é particularmente eficaz, mesmo em estudos em que está associado a outros antituberculosos. Fortún e colaboradores, em 2005, acompanharam a evolução de 5 doentes com tuberculose multirresistente tratados com sucesso com linezolide, em combinação com outros antituberculosos. A maior parte destes já haviam sido utilizados

em tratamentos anteriores sem sucesso, o que permite concluir a eficácia da atividade do linezolid.

Apesar de recentemente, em 2007, Richter e colaboradores terem reportado as primeiras estirpes resistentes ao linezolid, o desenvolvimento de resistências a este fármaco continua a ser raro, o que constitui uma das suas principais vantagens. Se por um lado o seu mecanismo de ação particular, não partilhado por outros antibióticos, torna pouco provável a existência de resistência cruzada ao linezolid (Erturan, Z. et al, 2005), por outro o seu perfil farmacodinâmico favorável permite-lhe manter níveis plasmáticos e/ou intracelulares superiores à *Mutation Prevention Concentration*, o que pode atrasar o aparecimento de resistências (Rodriguez, C. et al, 2004).

A linezolid é administrada por via oral e por via intravenosa. A absorção oral é rápida, atingindo-se o pico sérico 2 horas após a sua ingestão. Esta sofre metabolização hepática, produzindo dois metabolitos, o ácido aminoetoxiacético e hidroxietilglicina, inativados microbiologicamente. Cerca de 80% da dose é eliminada por via renal e cerca de 10% nas fezes (Sousa, J., 2006). Apesar de ser eliminada por via urinária, não necessita de ajustes de terapêutica nos pacientes com insuficiência renal. Atravessa a barreira placentária e é excretado no leite materno, sendo também parcialmente removido por hemodiálise.

Antibióticos de 1ª linha	Efeitos adversos
Rifampicina	<ul style="list-style-type: none">• Perturbações digestivas – anorexia, náuseas, dores abdominais e por vezes diarreia;• Efeitos hepatotóxicos;• Hipersensibilidade – urticária, vasculite cutânea, eosinofilia, hemodiálise ou falência renal;• Efeitos imunossupressores – sobre os linfócitos;• Efeitos indutores sobre o citocromo P₄₅₀ – diminui a concentração plasmática de outros fármacos coadministrados (ex: macrólidos, fluconazol, varfarim, entre outros).
Isoniazida	<ul style="list-style-type: none">• Neurotoxicidade;• Neurite retrotubular;

	<ul style="list-style-type: none"> • Excitabilidade, depressão, perda de memória, hiperglicemia, acidose metabólica, e tremuras; • Hepatotoxicidade – aumenta os valores das transaminases, da bilirrubina sérica e necrose das células hepáticas; • Reações alérgicas – febre, prurido e rash cutâneo. Pode ocorrer síndrome semelhante ao lúpus eritematoso, havendo produção de anticorpos antinucleares; • Interações com outros fármacos coadministrados – aumenta a concentração sérica de fármacos de metabolização hepática exaltando os seus efeitos adversos, tais como a fenitoína, varfarim, ciclosporina e teofilina. A rifampicina e etanol aumentam a metabolização hepática de isoniazida.
Etambutol	<ul style="list-style-type: none"> • Perturbações gastrointestinais; • Reações alérgicas; • Neurite retrotubular; • Diminuição da depuração renal dos uratos, podendo ocorrer gota; • Efeitos teratogénicos.
Estreptomicina	<ul style="list-style-type: none"> • Parestesia da boca; • Vertigens; • Ataxia e dor de cabeça; • Rash, eosinofilia, febre da droga e dermatite – normalmente resolvido com anti-histamínicos; • Perturbações vestibulares – afeta o epitélio sensorial do labirinto; • Bloqueio neuromuscular.
Pirazinamida	<ul style="list-style-type: none"> • Perturbações gastrointestinais; • Reações de hipersensibilidade e fotossensibilidade; • Paragem renal – reversível, resolúvel com a paragem de tratamento, causando hiperuricemia por diminuição da excreção renal dos uratos, podendo causar também nefrite intersticial; • Hepatotoxicidade – quando associada a outros

	<p>antituberculosos hepatotóxicos como a rifampicina e isoniazida, provocando um aumento das enzimas hepáticas transaminases e bilirrubinas;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Artralgias – solucionado com a coadministração de aspirina.
Antibióticos de 2ª linha	Efeitos adversos
PAS	<ul style="list-style-type: none"> • Perturbações digestivas – anorexia, náuseas e vômitos; • Reações de hipersensibilidade; • Hipotireoidismo.
Ciprofloxacina	<ul style="list-style-type: none"> • Perturbações digestivas; • Perturbações do SNC; • Reações de fotossensibilidade; • Tendinites; • Artropatias; • Efeitos cardiovasculares.
D-Cicloserina	<ul style="list-style-type: none"> • Neurotoxicidade – psicose, delírio, confusão, dor de cabeça e convulsões; • Reações de hipersensibilidade; • Manifestações cutâneas; • Náuseas; • Diarreia.
Ofloxacina	<ul style="list-style-type: none"> • Reações de hipersensibilidade; • Efeitos neurológicos e cardiovasculares; • Reações de fotossensibilidade; • Artropatias; • Tendinite; • Neurotoxicidade; • Efeitos gastrointestinais; • Alterações hematológicas. <p>Pode agravar os efeitos adversos de outros fármacos tomados em</p>

	concomitância de metabolização hepática.
Canamicina	<ul style="list-style-type: none"> • Reações de hipersensibilidade; • Ototoxicidade; • Efeitos nefrotóxicos.
Amicacina	<ul style="list-style-type: none"> • Ototoxicidade; • Nefrotoxicidade; • Reações de hipersensibilidade.
Etionamida	<ul style="list-style-type: none"> • Perturbações digestivas – náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, excessiva salivação e gosto metálico; • Reações de hipersensibilidade; • Alopecia; • Ginecomastia; • Hipertensão; • Impotência; • Perturbações mentais; • Hipoglicemia; • Neuropatias periféricas; • Efeitos hepatotóxicos – diminuídos com a coingestão de piridoxina.
Capreomicina	<ul style="list-style-type: none"> • Ototoxicidade; • Nefrotoxicidade; • Problemas hematológicos; • Bloqueio neuromuscular.
Linezolide	<ul style="list-style-type: none"> • Náuseas; • Diarreia; • Candidíase oral; • Cefaleias; • Mielossupressão em administração prolongada; • Neuropatia periférica e ótica; • Hepatotoxicidade.

Tabela 3 – Efeitos secundários mais descritos na terapia com antituberculosos. (Lorent, N. et al, 2011; Mitnick, C. et al, 2009; Pina, J. 2000; Sousa, J. 2006).

5. IMUNOPROFILAXIA

A vacinação é a melhor forma de prevenir qualquer risco de infeção (CDC, 1990; CDC, 1997; Decreto-Lei n.º 84/97; USDOL_OSHA, 1991; Diretiva 2000/54/CE do Parlamento Europeu e do Conselho; European Commission, 2002).

A vacinação com *Mycobacterium bovis* atenuado (bacilo de Calmette-Guérin – BCG) é habitualmente utilizada em países onde a tuberculose é endémica e responsável por morbilidade e mortalidade. Esta prática pode levar a uma significativa redução na incidência da tuberculose, quando administrada a pacientes jovens, uma vez que não se revela tão eficaz nos adultos (Álvares, E. 2009; Forbes, B. et al, 1998; Murray, P. et al, 2006).

No entanto, a imunização por BCG não pode ser efetuada a pacientes imunodeprimidos (e.g. HIV positivos), o que leva a concluir que em países com elevada prevalência de infectados por HIV (e.g. países africanos) a vacina não seja eficaz (Murray, P. et al, 2006).

Tal como Murray e seus colaboradores referem, um dos problemas adicionais à imunização por BCG é o desenvolvimento de reação positiva ao teste cutâneo em todos os doentes, podendo persistir por um período prolongado. Normalmente a reação ao teste é geralmente baixa. No entanto, se o halo for superior a 20 mm torna-se claramente significativa.

5.1. Vacina BCG

A vacina BCG faz parte do Plano Nacional de Vacinação (PNV) em Portugal e é administrada normalmente na maternidade (DGS, 2012).

A vacina BCG ideal deveria evitar a invasão pelo bacilo no organismo, proteger contra a tuberculose primária e secundária e contribuir para a destruição dos bacilos persistentes (Álvares, E. 2009).

Segundo a Direcção Geral de Saúde, a vacina BCG foi introduzida pela primeira vez no mercado em 1921 e continua a ser a única vacina disponível para profilaxia da tuberculose. No entanto, apesar de quase um século de uso, continua a ser controversa a sua utilização, com larga amplitude de resultados quanto à sua eficácia, atribuível a factores epidemiológicos regionais e às sucessivas modificações genéticas das estirpes vacinais (Álvares, E. 2009; Forbes, B. et al, 1998; Pina, J. 2000).

Sendo a mais largamente utilizada, é a vacina com maior incidência de complicações graves, sobretudo por causa das adenites. Estas infeções tendem a desaparecer se a técnica de punção for executada por profissionais de saúde qualificados e a utilização do material mais apropriado for a mais correta (Pina, J. 2000).

A BCGite generalizada é uma rara complicação da vacina, geralmente relacionada com imunodeficiência do paciente. Nas complicações generalizadas após vacina BCG, a terapêutica sistémica com isoniazida e rifampicina é eficaz (Pina, J. 2000).

São contraindicações para a toma da vacina BCG os seguintes factores: gravidez e aleitamento, recém-nascidos com peso à nascença inferior a 2000 gramas; latentes filhos de mães HIV positivo (até à exclusão da infeção na criança); recém-nascido familiar direto de doente com suspeita ou confirmação de imunodeficiência primária (até à exclusão da imunodeficiência na criança); imunodeficiência celular, congénita ou adquirida, a fazer tratamentos imunossupressores ou infectados com HIV; portadores de doença sistémica grave ou doença aguda grave; doença cutânea generalizada; doentes sob tratamento com antibióticos com atividade tuberculostática; portadores de tuberculose ativa; prova de tuberculina positiva e mal nutrição grave (DGS, 2012).

Na tuberculose, a principal resposta imunológica consiste no desenvolvimento da imunidade celular, que se torna detetável algumas semanas após a infeção natural ou a vacinação BCG (Mandell, G. et al, 2005; Marmion, P. et al, 1993; Pina, J. 2000).

Essa imunidade é demonstrada pela evidência da reação retardada de hipersensibilidade, que se segue à administração intradérmica de tuberculina, que é uma preparação dos antígenos proteicos extraídos do bacilo da tuberculose. Este teste designa-se Prova de Mantoux. O resultado positivo num indivíduo que não tenha sido vacinado pelo BCG indica que houve infeção tuberculosa, recente ou antiga, mas não necessariamente que exista tuberculose ativa (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000; Mandell, G. et al, 2005; Marmion, P. et al, 1993; Miller, O. et al, 1999; Pina, J. 2000).

A Prova de Mantoux é um método padrão em que se injeta por via intradérmica no antebraço uma dose de prova de 0,1 ml de Derivado Proteico Purificado (DPP) ou de Tuberculina com 5 unidades tuberculínicas. Após 72 horas, examina-se e palpa-se o local injetado. O desenvolvimento de uma zona dura palpável, firme e de diâmetro superior a 10 mm é registado como uma reação positiva. Se a reação for negativa, a prova deve ser repetida com 100 unidades de tuberculina (Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005; Marmion, B. P. et al, 1993; Miller, O. et al, 1999; Pina, J. 2000).

Todos os resultados de reação positiva na prova de tuberculina (> 10 mm) devem ser sujeitos a confirmação através de radiografia ao tórax e exame micobacteriológico ao esputo (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000). No entanto, resultados falsos positivos podem ser originados por contacto com micobactérias não tuberculosas ou reações com vacina BCG. Os resultados falsos negativos da prova da tuberculina podem ser originados quando há conhecimento prévio de contágio com o bacilo da tuberculose, estado imunitário deficiente, se o teste foi efetuado antes das 8 semanas após contágio (período de incubação), vacinação anti-viral com vírus vivo (parotidite ou rubéola) recente, má técnica ou desnutrição com emagrecimento recente (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al, 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al, 2005).



Figura 25 – Prova de Mantoux e leitura da reação

Existem outras armas terapêuticas complementares, como a corticoterapia, drenagem pleural e pericárdica, cinesiterapia respiratória e cirurgia para remoção de sequelas da tuberculose (Álvares, E. 2009).

6. PREVENÇÃO E CONTROLE

A tuberculose afeta cerca de 1 terço da população mundial. A sua erradicação é altamente improvável. No entanto, a doença e sua disseminação pode ser controlada, com uma combinação de vigilância ativa, intervenção profilática e terapêutica e a cuidadosa monitorização dos casos (Jawetz et al, 2005; Murray, P. et al, 2006).

Segundo a DGS, a melhor estratégia no sentido de combater esta doença será:

- Proceder à vacinação BCG nos recém-nascidos e revacinação, de acordo com os Planos Regionais de Vacinação;
- Promover ações de rastreio da tuberculose na população-alvo (portadores de HIV/SIDA, toxicodependentes, alcoólicos, reclusos, imigrantes, profissionais de saúde, diabéticos, internados em lares de idosos e instituições psiquiátricas);
- Implementar o diagnóstico precoce da tuberculose e participar no acompanhamento dos doentes, referenciando-os para uma consulta de especialidade;
- Notificar, nos termos da Portaria nº 12/99, de 25 de Março, os casos de tuberculose no prazo máximo de 48 horas;
- Corresponsabilizar as Unidades de Saúde na luta contra a tuberculose;
- Proceder à vigilância de contactos;
- Assegurar que a interligação Internamento/Ambulatório se faz de forma eficaz;
- Desenvolver e colaborar em ações de formação e actualização de todos os profissionais de saúde;
- Assegurar que os princípios definidos para o tratamento da tuberculose, consagrados no Programa Global de Controlo de Tuberculose da OMS, sejam aplicados, nomeadamente a generalização do DOT (tratamento directamente observado);
- Definir redes de diagnóstico, tratamento e notificação e identificar precocemente casos de doença e infeção.

7. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

Em 2009, a Direção Geral de Saúde emitiu um programa de prevenção e controlo das doenças respiratórias, em que o objetivo é reduzir a prevalência da tuberculose, bem como a transmissão da doença, prevenindo ao mesmo tempo o desenvolvimento de resistência aos fármacos.

São de extrema importância os estudos epidemiológicos das doenças infecciosas (e.g. tuberculose), pois permitem um melhor conhecimento da realidade infecciosa, como se está a difundir o agente etiológico, mecanismos de resistência que possam estar a ser criados, auxiliando assim os clínicos a agirem de forma rápida e correta no combate a esta doença.

Sendo a tuberculose uma doença de declaração obrigatória, e um problema de saúde pública, segundo a OMS, torna-se primordial a execução de estudos nos mais diversos locais, passíveis de se obter uma boa amostra a estudar, nomeadamente centros hospitalares, e de estudos epidemiológicos, no sentido de poder auxiliar os clínicos, assim como informar e formar os pacientes quanto à realidade da doença e tudo o que se pode fazer para a prevenir. O estudo de resistências torna-se primordial, no sentido de estas serem precocemente identificadas, para que assim se possa impedir a sua disseminação genética.

7.1. Objetivos

Os objetivos específicos desta investigação são:

- 1 - Estudar o perfil de suscetibilidade do MTC aos antibióticos de acordo com as orientações da CLSI no CHEDV, com recurso a amostras provenientes da Consulta, do Internamento e da Urgência deste centro hospitalar;
- 2 - Verificar possíveis alterações nos padrões de suscetibilidade aos antibióticos utilizados no tratamento da tuberculose;
- 3 - Encontrar eventuais relações entre as variáveis estudadas e comparação com os dados nacionais publicados pela Direção Geral de Saúde e ARS Norte;
- 4 - Avaliar e interpretar os resultados obtidos no sentido de conhecer possíveis alterações de suscetibilidades e padrões de resistências.

7.2. Amostra populacional

A amostra populacional deste estudo corresponde aos pedidos de pesquisa de MTC ao SPC nas mais diversas amostras biológicas, provenientes de todos os serviços do CHEDV, durante o período de tempo compreendido entre 1 de julho de 2006 e 30 de junho de 2011.

Foram realizados neste período de tempo 6092 pedidos para pesquisa de MTC. Foram identificadas 470 amostras com identificação positiva para *Mycobacterium spp.* Destas 394 são positivas para MTC e 76 são positivas para MNT.

7.3. Amostra laboratorial

Das 6092 amostras recebidas no laboratório para pesquisa de MTC, 470 obtiveram resultado positivo. No entanto, apenas foram realizados os antibiogramas em 145 pacientes, uma vez que o número de amostras positivas revela-se como sendo o resultado de todas as amostras biológicas que chegaram ao laboratório. O procedimento correto seria a execução de um antibiograma por paciente; no entanto, na nossa amostra de estudo, existem pacientes com perfis de suscetibilidade em mais do que um produto biológico. Esta situação poderá ter ocorrido por solicitação médica expressa. No entanto, neste estudo apenas irá ser estudado um perfil de suscetibilidade por paciente, a não ser que os perfis estudados no mesmo paciente apresentem diferenças. Esta situação permite um melhor estudo estatístico. Assim, em 132 pacientes com amostras positivas, foi determinado o perfil de suscetibilidade do MTC aos antibióticos de 1ª linha no Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho (CHVNG/Espinho). Nos casos de multirresistência, as amostras foram enviadas para o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), para que fossem estudadas as suscetibilidades aos antimicrobianos de 2ª linha. Deste estudo também se obteve um total de 57 pacientes com identificação positiva para MNT.

7.4. Tratamento estatístico

Na análise estatística dos dados utilizou-se o programa Microsoft Office Excel 2007. Foram utilizados dados informatizados disponibilizados pelo Serviço de Patologia Clínica, contendo informações relativas a idade, sexo, serviço que solicitou as análises micobacteriológicas, tipo de amostra, número de processo (apenas para se identificar

pacientes com várias amostras), data de realização do exame, identificação do microrganismo encontrado e perfil de suscetibilidade de cada um dos pacientes estudados.

7.5. Material e métodos

7.5.1. Diagnóstico laboratorial e preparação da amostra no CHEDV

7.5.1.1. Colheita de amostras para pesquisa de MTC

As amostras clínicas utilizadas no diagnóstico laboratorial de tuberculose são: esputo, urina, fezes, líquidos (LCR, ascítico, pleural, pericárdico e pús entre outros), assim como amostras de tecidos e sangue (Ferreira, W. et al, 2000; Ferreira, W. et al, 2010; Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005; Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009; Pina, J. 2000).

A amostra deve ser colhida antes do início da antibioterapia. O recipiente devidamente esterilizado deve chegar ao laboratório com a identificação correta do paciente. A colheita deve ser realizada de forma asséptica de forma a minimizar possíveis contaminações, até mesmo com a flora endógena. A quantidade de amostra a colher deve ser a suficiente para que se possam realizar todos os testes necessários. As quantidades solicitadas pelo laboratório são as seguintes:

- Lavado brônquico – 5ml;
- LCR – 2ml;
- Suco gástrico – 5 a 10 ml;
- Fezes – 1gr;
- Urina – 40 ml (jacto médio);
- Líquidos – mínimo de 15 ml (maior quantidade possível).

As colheitas de amostras biológicas em zaragatoas não são recomendáveis para a pesquisa e isolamento do MTC, sendo apenas aceitáveis quando a quantidade de amostra possível de colheita não o permitir de outra forma. No entanto, devemos salientar que amostras em quantidades reduzidas podem originar resultados negativos que poderão não ser representativos do verdadeiro resultado, ou seja, podem ser falsos negativos. As amostras que são colhidas durante 24 horas (e.g. urina de 24 horas) não devem ser processadas, uma vez que podem estar diluídas ou contaminadas (Ferreira,

W. 2010; Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005; Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009; Murray, P. et al, 2003).

A manipulação das amostras deve ser cuidadosa, de forma a evitar a contaminação cruzada, assim como a contaminação do técnico, tendo sido realizadas todas as técnicas de preparação de amostras em câmara de fluxo laminar em salas de pressão negativa com material esterilizado e equipamento de proteção individual adequado (Ferreira, W. 2010; Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005; Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009; Murray, P. et al, 2003).

7.5.1.2. Transporte e conservação de amostras

As amostras colhidas devem ser rapidamente enviadas ao laboratório em contentores estéreis. Após registo informático são processadas logo que possível. À exceção do sangue, que deve permanecer à temperatura ambiente, todas as amostras devem ser refrigeradas até ser possível o seu processamento. Não se deve congelar as amostras, uma vez que a congelação pode inibir o crescimento das micobactérias (Ferreira, W. 2010; Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005; Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009; Murray, P. et al, 2003).

Quando uma amostra não reúne as condições necessárias para o seu processamento, deve ser rejeitada, devendo o clínico ser informado da ocorrência. Deve-se orientar o clínico acerca das condições necessárias para obtenção de uma amostra aceitável, tendo em conta a situação clínica do paciente (Ferreira, W. 2010; Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005; Lago, J. 2009; Murray, P. et al, 2003).

7.5.1.3. Processamento de amostras para pesquisa de micobactérias

Para volumes superiores a 10 ml, as amostras devem ser concentradas por centrifugação a 3000 x g (3800 rpm - rotações por minuto), durante 20 minutos. Se a amostra for demasiadamente viscosa, tratar apenas 5 ml e conservar o excedente refrigerado entre 2°C a 8°C (Forbes, B. et al 1998; Isenberg, H. 2005). Após centrifugação deve decantar-se o sobrenadante, e se necessário ressuspender com 2 ml a 5 ml de água destilada.

No caso dos sucos gástricos, a amostra deve ser processada o mais rapidamente possível após a colheita. Caso o processamento ultrapasse as 4 horas, a amostra deve ser neutralizada com aproximadamente 100 mg de carbonato de sódio e refrigerada.

Caso a amostra seja mucopurulenta, adicionar 50 mg a 100mg de NALC (N-Acetil-L-Cisteína) por 50 ml de amostra e agitar no vórtex (aproximadamente 30 segundos). (Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005).

Relativamente aos pús e líquidos purulentos, deve lavar-se a amostra/sedimento com água destilada 1 ou 2 vezes, para eliminar substâncias tóxicas ou nocivas para as micobactérias presentes na amostra, e se necessário macerar a amostra num almofariz com água destilada para fluidificar a amostra (Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005).

Nas amostras de biopsias, a amostra deve ser aseticamente homogeneizada num almofariz, com um pouco de água destilada estéril. Se necessário, a amostra deve ser previamente cortada com ajuda de bisturi. Inocula-se uma porção da amostra em Middlebrook 7H9 (Meio de enriquecimento e crescimento) e incuba-se a 37°C durante 8 dias. Após este período, é efetuada uma prova de esterilidade em gelose de chocolate para se decidir se pode seguir diretamente para identificação, ou se tem de ser descontaminada (Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005).

No caso de amostras de urina, devem chegar ao laboratório no máximo quatro tubos de 50 ml. Esta deve ser centrifugada a 3800 rpm durante 20 minutos. Decanta-se o sobrenadante e junta-se os sedimentos num volume máximo de 10 ml (Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005).

As amostras de fezes, por sua vez, já requerem um tratamento diferente. Inicialmente é efetuado um esfregaço, que será corado pela técnica de Ziehl-Neelsen e observado ao microscópio. Caso não se observem BAAR, a amostra não deve ser processada. Caso sejam observados BAAR, deve ser efectuada uma suspensão de cerca de 1 gr de fezes em 10 ml de água destilada estéril, que será a nossa amostra para posterior descontaminação (Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005).

Apesar de se tratar de amostras colhidas de locais habitualmente estéreis (à exceção das fezes e do esputo), devem ser efetuadas as provas de esterilidade em Gelose de Chocolate (GC), que incuba 48 horas em estufa com CO₂ a 37°C (Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005; Lago, J. 2009).

7.5.1.4. Métodos de descontaminação

7.5.1.4.1. Método de N-Acetil-L-Cisteína Hidróxido de Sódio (NALC-NaOH).

É utilizado para amostras de esputo obtidas por expectoração induzida, secreções respiratórias, aspirado brônquico, lavado broncoalveolar (caso se suspeite que a amostra esteja contaminada com *Pseudomonas* ou *Proteus*, usar o método do ácido oxálico a 5%), suco gástrico, pús ou líquidos purulentos, LCR, líquido pleural, líquido ascítico e líquido pericárdico e material de biopsia (Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005; Lago, J. 2009; Murray, P. et al, 2003).

Procedimento:

- Num tubo de centrífuga estéril de 50 ml, com tampa de rosca, colocar a amostra/sedimento (máximo de 10 ml) e adicionar igual quantidade de solução de NALC-NaOH ativada. Caso se trate de uma amostra extremamente viscosa deve-se adicionar um pouco de NALC (pó);
- Enroscar bem a tampa do tubo e agitar no vórtex até a amostra estar liquefeita (5 a 30 segundos). Se a amostra é especialmente viscosa adicionar mais solução de NALC-NaOH e agitar novamente;
- Deixar repousar 15 minutos à temperatura ambiente. Deve evitar-se o tratamento excessivo da amostra;
- Completar o volume de 50 ml com tampão fosfato BBL MycoPrep (pH 6,8) e homogeneizar por inversão;
- Centrifugar durante 20 minutos a 3000 x g (3800 rpm);
- Rejeitar cuidadosamente todo o sobrenadante num recipiente apropriado, nível IV com desinfetante (solução de hipoclorito de sódio);
- Ressuspender o sedimento com 1-2 mL de tampão fosfato BBL MycoPrep (pH 6,8) ou água destilada estéril;
- Verificar o pH, que deve estar entre 6,8-7,0 e corrigir, se necessário, com NaOH 4% ou HCl 0,2M;
- Proceder à inoculação dos meios e preparação dos esfregaços. Os esfregaços devem ser preparados de forma a ficarem com fímbrias;

- Conservar no frigorífico o sedimento excedente para procedimentos posteriores, caso seja necessário.

7.5.1.4.2. Método do ácido sulfúrico a 4%

É utilizado em amostras de urina (Forbes, B. et al, 1998; Lago, J. 2009; Murray, P. et al, 2003).

Procedimento:

- Num tubo de centrifuga estéril de 50 ml, com tampa de rosca, colocar o sedimento e adicionar igual quantidade de ácido sulfúrico a 4%;
- Enroscar bem a tampa do tubo e agitar no vórtex (5 a 30 segundos);
- Deixar repousar 15 minutos à temperatura ambiente;
- Completar o volume de 50 ml com tampão fosfato BBL MycoPrep (pH 6,8) e homogeneizar por inversão;
- Centrifugar durante 20 minutos a 3000 x g (3800 rpm);
- Decantar cuidadosamente todo o sobrenadante num recipiente apropriado com desinfetante (solução de hipoclorito de sódio);
- Ressuspender o sedimento com 1-2 ml de tampão fosfato BBL MycoPrep (pH 6,8);
- Verificar o pH, que deve estar entre 6,8-7,0 e corrigir, se necessário, com NaOH 4% ou HCl 0,2M;
- Proceder à inoculação dos meios e preparação dos esfregaços. Os esfregaços devem ser preparados de forma a ficarem com fímbrias;
- Conservar no frigorífico o sedimento excedente para procedimentos posteriores, caso seja necessário.

7.5.1.4.3. Método do ácido oxálico a 5%.

Este método de descontaminação é utilizado nas amostras de fezes e em todas as amostras do tracto respiratório superior e inferior em que haja suspeita que a estejam contaminadas com *Pseudomonas* ou *Proteus*. A presença de bronquiectasias nas

amostras clínicas, também leva à utilização deste método de descontaminação (Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005; Lago, J. 2009; Murray, P. et al, 2003).

Procedimento:

- Num tubo de centrifuga estéril de 50 ml, com tampa de rosca, colocar a amostra/sedimento (máximo de 10 ml) e adicionar igual quantidade de ácido oxálico a 5%;
- Enroscar bem a tampa do tubo e agitar no vórtex até a amostra estar liquefeita (5 a 30 segundos);
- Deixar repousar 30 minutos à temperatura ambiente;
- Completar o volume de 50 ml com soro fisiológico estéril a 0,85% e homogeneizar por inversão;
- Centrifugar durante 20 minutos a 3000 x g (3800 rpm);
- Rejeitar cuidadosamente todo o sobrenadante num recipiente apropriado com desinfetante (solução de hipoclorito de sódio);
- Ressuspender o sedimento com 1-2 ml de soro fisiológico estéril a 0,85% ou água destilada estéril;
- Verificar o pH, que deve estar entre 6,8-7,0 e corrigir, se necessário, com NaOH 4% ou HCl 0,2%;
- Proceder à inoculação dos meios e preparação dos esfregaços. Os esfregaços devem ser preparados de forma a ficarem com “fímbrias”;
- Conservar no frigorífico o sedimento excedente para procedimentos posteriores, caso seja necessário.

Uma vez que se trata de amostras não estéreis, o meio líquido - MYCO/FSputa - deve ser suplementado com o antimicrobiano PANTA/F, devendo proceder-se da seguinte forma:

- Reconstituir um frasco de PANTA/F com 10 ml de Suplemento/F;
- Depois de reconstituído deve ser utilizado no prazo máximo de 2 horas ou conservado entre -20 a -70°C por um período de cerca de 6 meses;
- Desinfetar a membrana do frasco MYCO-Sputa com desinfetante micobactericida, seguido de álcool a 70%;

- Adicionar asseticamente 2 ml de PANTA reconstituído ao frasco de MYCO-Sputa.

Posteriormente deve-se proceder-se á:

- Inoculação de 2 meios de Lowenstein-Jensen (0,2 ml);
- Inoculação de 1 MYCO/F Sputa (0,5 ml);
- Preparação de 2 esfregaços.

Os meios de Lowenstein-Jensen devem incubar na estufa a 37°C, com uma atmosfera de 5% a 10% de CO₂, durante 42 dias (Isenberg, H. 2005).

Durante a primeira semana de incubação, as roscas das tampas dos tubos devem estar ligeiramente frouxas. Após este período devem ser devidamente atarraxadas, para evitar a desidratação do meio (Isenberg, H. 2005).

O meio líquido MYCO/F Sputa deve ser introduzido no BACTEC 9000 (Isenberg, H. 2005; Lago, J. 2009).

Os esfregaços devem permanecer durante uma noite na câmara de segurança biológica, posteriormente fixados e corados pela coloração de Auramina-Rodamina. Após fixação, apenas um dos esfregaços deve ser corado, sendo o segundo devidamente conservado. Conservar no frigorífico o sedimento excedente para procedimentos posteriores, tais como confirmações de resultados, caso seja necessário (Isenberg, H. 2005).

Sangue

Para amostras de sangue apenas se deve colher asseticamente 5 ml de sangue e inocular directamente num Myco/F Lytic. Se a hemocultura positivar é necessário fazer duas lâminas para coloração de Gram e Ziehl-Neelsen, assim como ser efectuada a prova de esterilidade em GC (Isenberg, H. 2005).

7.5.1.5. Repicagem de culturas positivas em meio líquido

Quando um frasco de meio líquido (MYCO) positiva deve-se:

- Desinfectar a membrana do frasco MYCO com um micobactericida, seguido de álcool a 70%;

- Com seringa e agulha aspirar cerca de 0,5 ml;
- Preparar 2 esfregaços (para coloração de Gram e Ziehl);
- Inocular um meio de gelose de chocolate e incubar a 37°C em estufa com CO₂ durante 48 horas.

Se a Gelose de chocolate estiver estéril após 48 horas, e houver presença de BAAR no exame direto, segue para identificação da bactéria no CHVNG/Espinho.

7.5.1.6. Repicagem de culturas positivas em meio sólido (Lownstein-Jensen(L-J))

O bacilo da tuberculose é aeróbio estrito e prolifera a temperaturas compreendidas entre os 30 e os 41°C, na temperatura ideal de 37°C. O seu crescimento em meio de Lowenstein-Jensen (LJ) é lento e as colónias só se tornam visíveis ao fim de 2 a 3 semanas. No entanto, se permanecer negativo, deve prolongar-se a incubação até cerca das 6 a 8 semanas, antes de se concluir a ausência de bacilos da tuberculose (Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005; Murray, P. et al, 2003).

No meio de LJ as colónias são rugosas, de cor amarelada e friáveis quando se utilizam na preparação de esfregaços (Figura 26) (Ferreira, W. et al, 2000; Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005; Marmion, P. et al, 1993; Murray, P. et al, 2003).

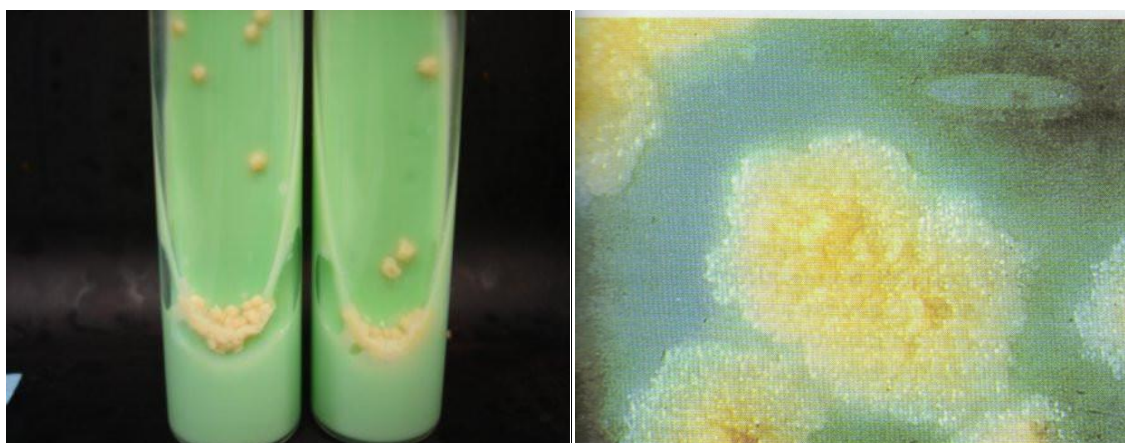


Figura 26 – Colónias de MTC em meio sólido de LJ

Caso se detetem colónias sugestivas de micobactérias, deve-se repicar com uma ansa a colónia sugestiva e preparar dois esfregaços, para coloração de Gram e ZN.

7.5.1.7. Preparação de esfregaços para identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) – exame direto

As lâminas utilizadas para a preparação de esfregaços devem ser previamente desengorduradas (imersas em etanol ou numa solução de álcool-ácido a 0,5%). Estas devem ser devidamente identificadas com o número do paciente, tipo de amostra e data de preparação. Depois de efetuado, o esfregaço deve secar dentro da câmara de segurança biológica com os raios ultravioletas ligados pelo menos 30 minutos (Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005).

Os esfregaços podem ser fixados por calor, através da passagem dos esfregaços pela chama azul da chama duma tocha, cerca de 3 a 4 vezes (não aquecer demasiado), ou por metanol absoluto, durante cerca de 5 minutos (método preferencial).

7.5.1.8. Técnicas de coloração para deteção de BAAR

7.5.1.8.1. Coloração pela técnica de Gram

Esta técnica de coloração é realizada para que possam ser verificadas possíveis contaminações da amostra, uma vez que os BAAR não coram pela técnica de Gram. Uma lâmina corada pela técnica de Gram com presença de bactérias, efectuada a partir de um meio de cultura de micobactérias, indica contaminação da amostra biológica, logo um resultado falso positivo (Isenberg, H. 2005).

Procedimento:

- Cobrir o esfregaço previamente fixado com violeta de genciana;
- Aguardar cerca de 2 minutos;
- Passar o esfregaço por água;
- Cobrir o esfregaço com Lugol e aguardar 1 minuto;
- Passar o esfregaço por água;
- Descorar com álcool-acetona (durante alguns segundos);

- Passar o esfregaço por água;
- Remover o excesso de água;
- Cobrir o esfregaço com safranina e aguardar cerca de 1 minuto;
- Passar o esfregaço por água;
- Deixar secar;
- Observar ao microscópio.

7.5.1.8.2. Coloração de Ziehl-Neelsen

Como já foi descrito anteriormente, nas bactérias do Género *Mycobacterium* a PC apresentam uma forma peculiar o que a torna impermeável aos corantes do Gram e a maioria dos antibióticos convencionais. Neste caso, serão necessárias técnicas de coloração especiais, tais como a técnica de Ziehl-Neelsen (Forbes, B. et al, 1998; Isenberg, H. 2005; Murray, P. et al, 2003).

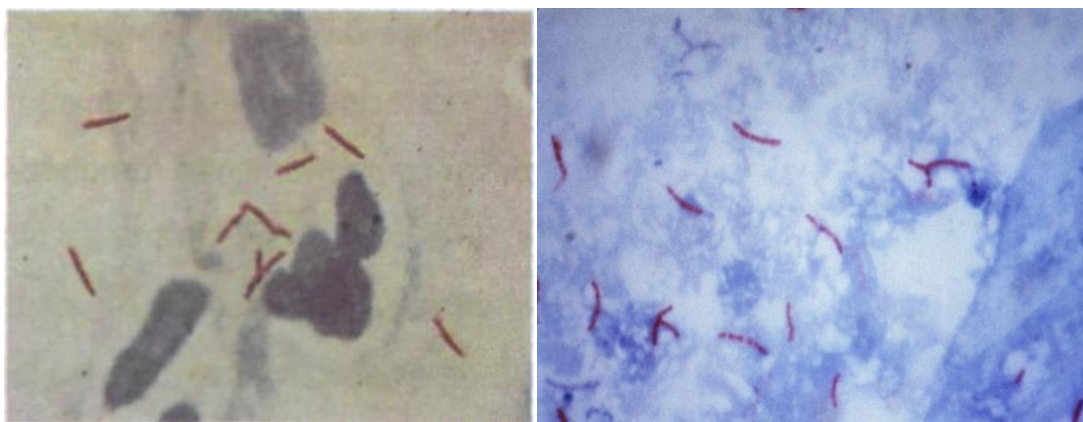


Figura 27 – Bacilos de MTC corados de vermelho pela técnica de Ziehl-Neelsen (Ferreira, W., 2010; Sousa, J., 2006)

Procedimento:

- Cobrir o esfregaço previamente fixado com fucsina básica;
- Com uma chama aquecer o esfregaço até fumegar;
- Aguardar cerca de 10 minutos;
- Passar o esfregaço por água;

- Descorar com álcool-ácido a 3%, até não sair mais corante do esfregaço;
- Passar o esfregaço por água;
- Remover o excesso de água;
- Cobrir o esfregaço com o corante de contraste (Azul de metileno) e aguardar cerca de 1 a 2 minutos;
- Passar o esfregaço por água;
- Deixar secar;
- Examinar o esfregaço com objectiva de imersão (100X).

Nota: Deve utilizar-se um esfregaço controlo em cada série.

A baciloscopia é um método rápido, económico, eficaz e fácil de realizar. Permite um diagnóstico e monitorização terapêutica mais rápida, permitindo o resultado ao clínico no próprio dia. Pode ser efetuado diretamente do produto biológico ou a partir do concentrado, após descontaminação. É um exame com baixa sensibilidade (50 a 70%), pois a visualização de BAAR varia com o tipo e número de amostras por doente, a espécie em causa, a técnica de coloração e o treino e persistência da visualização microscópica (5 a 20 minutos/lâmina). A sensibilidade é mais baixa nos casos de tuberculose extrapulmonar e nas doenças causadas por MNT. Esta sensibilidade pode ser aumentada com a observação de mais de uma amostra por doente. Uma baciloscopia negativa não exclui o diagnóstico de tuberculose. Uma baciloscopia positiva não identifica o MTC, revelando unicamente a presença de BAAR (Ferreira, W. et al, 2000; Isenberg, H. 2005; Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009; Murray, P. et al, 2003).

7.5.1.8.3. Coloração de Auramina-Rodamina

Neste método, um corante fluorescente é utilizado para se ligar ao ácido micólico na parede celular das micobactérias. Ambas auramina e rodamina, são fluorocromos que podem ser usados para corar micobactérias. Quando coradas com fluorocromos, as micobactérias são amarelo brilhante (auramina O) ou vermelho laranja (rodamina) com um fundo negro devido ao contraste provocado pela presença de permanganato de potássio que torna o fundo da lâmina escuro (Figura 28). A vantagem de coloração com fluorocromos é que as lâminas podem ser analisadas utilizando uma objetiva de 25x, em vez da objetiva de 100x utilizada nas colorações de ZN. Esta ampliação menor permite

aumentar o campo visual diminuindo o tempo de análise microscópica. Tem o inconveniente de ser necessário um microscópio de fluorescência, que se torna mais dispendioso (Ferreira, W. et al, 2000; Isenberg, H. 2005; Jawetz et al, 2005; Lago, J. 2009; Maza, L. et al, 1999).

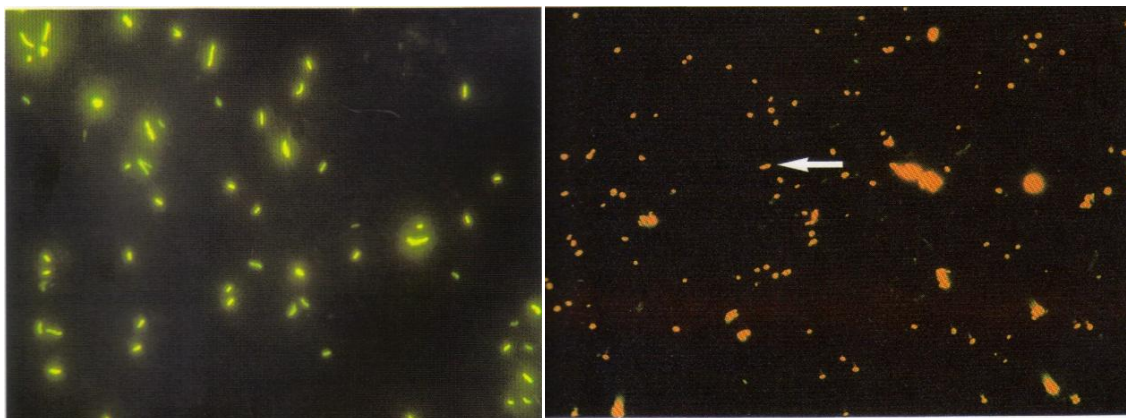


Figura 28 – Colorações ácido resistentes de MTC corado com as colorações fluorescentes de Auramina e Rodamina. (Forbes, B. et al, 1998; Maza, L. et al, 1999; Murray, P. et al, 2006)

Procedimento:

- Cobrir o esfregaço previamente fixado com auramina e aguardar cerca de 15 minutos;
- Passar o esfregaço por água;
- Descorar com álcool-ácido a 0,5%, até não sair mais corante do esfregaço;
- Passar o esfregaço por água;
- Remover o excesso de água;
- Cobrir o esfregaço com o corante de contraste (Fucsina ácida) e aguardar cerca de 1 a 2 minutos;
- Passar o esfregaço por água;
- Deixar secar ao abrigo da luz;
- Examinar o esfregaço com microscópio de fluorescência, utilizando objetiva de 20X ou 40X. A objetiva de 100X pode ser necessária para confirmar determinadas características morfológicas.

Nota: Deve utilizar-se um esfregaço controlo em cada série.

7.5.1.9. Meios de cultura

O Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) recomendou aos laboratórios que fossem efetuados todos os esforços no sentido de utilizarem os métodos mais rápidos disponíveis para o teste e diagnóstico de micobactérias. Estas recomendações incluem a utilização de um meio líquido e de um meio sólido para a cultura de micobactérias (BD, 2010; Forbes, B. et al, 1998; Lago, J. 2009).

Foram utilizados meios de cultura prontos a usar disponíveis no mercado e de acordo com as indicações de uso do fornecedor.

7.5.1.9.1. Gelose chocolate (PVX)

A gelose de chocolate (GC) utiliza-se adicionada à mistura PolyViteX. Este meio destina-se à cultura e ao isolamento de todo o tipo de estirpes aeróbias incluindo as mais exigentes que pertencem aos géneros *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus* entre outros.

Este meio é composto de uma base nutritiva, enriquecida em factor X (hemina) ocasionalmente pela hemoglobina. Os factores de crescimento indispensáveis, como o factor V (NAD), são fornecidos pela mistura PolyViteX. A GC é utilizada no estudo para avaliar a presença de contaminação das amostras.

7.5.1.9.2. Meio de Lowenstein-Jensen (LJ)

O meio de Lowenstein-Jensen (LJ) destina-se à cultura de micobactérias. Este meio, enriquecido com a presença de ovo, de asparagina e de fécula, favorece o crescimento das micobactérias. O verde de malaquite é incluído no meio para inibir o crescimento de outras bactérias (Isenberg, H. 2005; Jawetz et al, 2005).

7.5.1.9.3. Frascos de cultura BACTEC MYCO/F-Sputa

Os meios de cultura BACTEC MYCO/F-Sputa (meio líquido Middlebrook 7H9 modificado com CO₂) suplementados com o Suplemento/F BACTEC e com a mistura de antibióticos PANTA/F BACTEC quando for apropriado, são utilizados com o instrumento BACTEC da

série fluorescente 9000MB como um procedimento qualitativo para a cultura *in vitro* e para o isolamento de micobactérias (BD, 2010; Isenberg, H. 2005; Jawetz et al, 2005)

O sistema 9000 MB BACTEC MYCO/F-Sputa foi concebido para a detecção rápida de micobactérias exceto no sangue. O sistema inclui um meio de cultura líquido (frasco de cultura MYCO/F-Sputa), um suplemento de crescimento (Suplemento/F) e um suplemento de antibióticos (PANTA/F BACTEC). O suplemento contém promotores de crescimento para as micobactérias e também é utilizado para reconstituir o PANTA/F. Este contém agentes antimicrobianos utilizados para suprimir o crescimento de microrganismos contaminantes ou da flora normal que possam ter sobrevivido ao processo de descontaminação, sendo recomendada a sua utilização em todas as amostras não-estéreis. Cada frasco contém um sensor capaz de detetar diminuições de oxigénio dissolvido no meio, resultantes do metabolismo e do crescimento dos microrganismos. O sensor é monitorizado pelo instrumento relativamente ao aumento da fluorescência, o qual é proporcional à diminuição do conteúdo de oxigénio dissolvido. Uma leitura positiva indica a presença presuntiva de micobactérias viáveis no frasco. A detecção está limitada aos microrganismos que irão crescer no meio (BD, 2010; Isenberg, H. 2005).

7.5.1.9.4. Meio de cultura LYTIC

O meio de cultura BACTEC Myco/F Lytic, pertence ao sistema de BACTEC 9000MB, foi concebido para a detecção rápida de micobactérias no sangue. Este é uma formulação de meio líquido de Middlebrook 7H9 e de Infusão Cérebro Coração para o isolamento de micobactérias a partir de amostras de sangue. Neste meio foram efetuadas modificações específicas para potenciar o crescimento e isolamento de micobactérias. Estas modificações incluem o citrato de amónia férrico para fornecer uma fonte de ferro para estirpes específicas de micobactérias, a adição de saponina como um agente de lise do sangue e a adição de proteínas e açúcares específicos para fornecerem suplementos nutritivos. Cada frasco contém um sensor capaz de detetar diminuições na concentração de oxigénio no frasco, resultantes do metabolismo e do crescimento de microrganismos. O sensor é monitorizado pelo sistema BACTEC 9000MB relativamente ao aumento de fluorescência, o qual é proporcional à diminuição de oxigénio. Uma determinação positiva indica a presença presuntiva de microrganismos viáveis no frasco (BD, 2010; Isenberg, H. 2005).

Nota: De salientar que todas as técnicas anteriormente descritas se mantiveram inalteradas nos 5 anos de estudo.

7.5.2. Testes utilizados para execução de perfis de suscetibilidade do MTC no CHVNG/Espinho

O PNCI recomenda o recurso a testes de suscetibilidade aos antimicrobianos para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e que necessite de terapêutica antimicrobiana, sempre que a suscetibilidade não possa ser previsível pelo conhecimento da identidade do microrganismo (PNCI, 2004).

No caso em que a infeção seja provocada por um microrganismo cuja suscetibilidade a determinado antimicrobiano seja devidamente reconhecida e o doente seja alérgico a esse antimicrobiano, devem testar-se outros fármacos (PNCI, 2004).

O microrganismo é considerado sensível quando responde a terapêutica com o antimicrobiano utilizando a dosagem recomendada para o tipo de infeção e espécie bacteriana. Por outro lado, é considerado resistente quando é improvável obter uma boa resposta terapêutica às concentrações de antimicrobiano atingidas com as dosagens utilizadas e/ou está presente um mecanismo de resistência.

Apesar de toda a informação atualmente disponível, a interpretação dos testes de sensibilidade a antimicrobianos pressupõe um vasto conhecimento sobre os antimicrobianos, tais como da sua estrutura química, modo de ação, farmacocinética, farmacodinâmica, mecanismos de resistência e respectivos fenótipos, resistência intrínseca e correlação dos resultados *in vitro* com a resposta clínica à terapêutica.

O teste de sensibilidade antimicobacteriana (TSA) é importante para o tratamento adequado de doentes com tuberculose. O tratamento da tuberculose é frequentemente realizado através de um regime com vários fármacos que incluem a estreptomicina, a isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. Torna-se portanto primordial que os fármacos prescritos demonstrem uma atividade apropriada com o MTC, ou seja que a estirpe isolada seja sensível ao fármaco (BD, 2009).

O MTC resistente a vários fármacos (MDR-TB) tornou-se recentemente um grave problema de saúde pública. A resistência a qualquer um dos fármacos principais, a estreptomicina (STR), a isoniazida (INH), a rifampicina (RIF) o etambutol (EMB) e a pirazinamida (PZA) tornam o tratamento da doença mais difícil e dispendioso. A rápida

deteção destes isolados resistentes é essencial para um tratamento eficaz do doente (BD, 2009).

7.5.2.1. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste BACTEC MGIT 960 SIRE não é um método radiométrico, o que permite, na maioria dos casos, a obtenção mais precoce de resultados apropriados de sensibilidade. Este teste foi desenvolvido com concentrações críticas de rifampicina, estreptomicina, etambutol, isoniazida e pirazinamida. (BD, 2009; Forbes, B. et al, 1998; Murray, P. et al, 2003).

O BBL MGIT 7ml Mycobacteria Growth Indicator Tube (tubo indicador do crescimento de micobactérias) é um tubo que contém um Middlebrook 7H9 Broth modificado que sustenta o crescimento e o isolamento de micobactérias. Este contém na sua composição um composto fluorescente que é sensível à presença de oxigénio dissolvido no caldo. A concentração inicial de oxigénio dissolvido atenua a emissão proveniente do composto, tornando possível detetar um reduzido grau de fluorescência. Subsequentemente, microrganismos com proliferação e respiração ativa consomem o oxigénio, o que permite que o composto desenvolva fluorescência. (BD, 2009; Forbes, B. et al, 1998; Murray, P. et al, 2003).

O BACTEC MGIT 960 SIRE KIT é um teste qualitativo de 4 a 13 dias de duração para a estreptomicina, a isoniazida, a rifampicina e o etambutol, e de 4 a 21 dias para a pirazinamida. O teste baseia-se no crescimento de isolados de MTC num tubo que contém o fármaco, que é comparado com um tubo sem fármacos (controlo do crescimento). O instrumento BACTEC MGIT monitoriza os tubos relativamente a um aumento de fluorescência. A análise de fluorescência do tubo contendo o fármaco, comparativamente com a fluorescência presente no tubo de controlo do crescimento, é utilizada pelo instrumento para determinar os resultados de sensibilidade. O aparelho interpreta estes resultados automaticamente e reporta um resultado de sensível ou resistente (BD, 2009; Forbes, B. et al, 1998; Murray, P. et al, 2003).

As concentrações finais de antibiótico nos tubos MGIT são: para a estreptomicina (STR), 1,0 µg/ml; para a isoniazida (INH), 0,1 µg/ml; para a rifampicina (RIF) é de 1,0 µg/ml, para o etambutol (EMB) é de 5,0 µg/ml e para a pirazinamida (PZA) é de 100 µg/ml (BD, 2009), de acordo com as Guidelines publicadas pela OMS.

Segundo as orientações da NCCLS, as “concentrações críticas” das drogas antituberculosas são adotadas por uma convenção internacional. Para cada fármaco, a concentração crítica é a menor concentração de antibiótico que inibe 95% das estirpes de MTC, que não foram expostas ao fármaco, mas que simultaneamente não inibe estirpes consideradas resistentes em pacientes que não apresentam resposta ao tratamento.

7.5.2.2. Teste ProbeTec ET *Mycobacterium tuberculosis* Complex Direct Detection

A técnica para detecção direta do MTC BD ProbeTec ET, utiliza a tecnologia de amplificação por deslocamento de cadeias (SDA-Strand Displacement Amplification) para a detecção qualitativa direta de DNA do MTC proveniente de amostras clínicas respiratórias descontaminadas, tais como, esputo, lavados brônquios e outras. Esta detecção direta do MTC é efetuada em doentes não tratados e sob suspeita de estarem infectados com MTC. Considera-se os pacientes não tratados, aqueles que não receberam tratamento antituberculoso, não tenham recebido tratamento nos últimos 12 meses ou aqueles que têm menos de 7 dias de tratamento já efetuado (BD, 2010) .

A utilização de técnicas de amplificação de DNA, como a SDA, permite uma detecção e amplificação rápidas do DNA do MTC em amostras clínicas, favorecendo uma intervenção médica mais rápida e adequada ao doente (BD, 2010).

O ensaio BD ProbeTec ET *Mycobacterium tuberculosis complex* é baseado na amplificação e detecção simultâneas de DNA das micobactérias através de primers de amplificação e sondas de detecção marcadas com fluorescência. Após preparação da amostra esta é inoculada no poço de amplificação que contém duas enzimas (uma DNA polimerase e uma endonuclease restritiva) necessárias para a SDA. Os micropoços de amplificação são fechados hermeticamente para que não ocorra contaminações e incuba com um leitor de fluorescência de controlo térmico que controla a formação de produtos amplificados na reação (BD, 2010).

Cada reação coamplifica e deteta em controlo de amplificação interno. O objetivo deste controlo é confirmar a validade da reação de amplificação e identificar possíveis reações de inibição da amostra processada. Os resultados são reportados automaticamente pelo equipamento como positivos, negativos ou indeterminados (BD, 2010).

7.5.2.3. Teste GenoType MTBDR_{plus}

O teste GenoType MTBDR_{plus} é baseado na tecnologia DNA-STRIP e permite a identificação genética do MTC e da resistência à rifampicina e/ou isoniazida a partir de amostras em cultura ou amostras clínicas pulmonares com microscopia positiva. A identificação de resistência à rifampicina é facultada pela detecção das mutações mais significativas do gene *rpoB* (que codifica a subunidade β da RNA polimerase). Para testar o nível elevado de resistência à isoniazida é examinado o gene *katG* (que codifica a catalase peroxidase) e para testar o nível baixo de resistência à isoniazida é examinada a região promotora do gene *inhA* (que codifica o NADH-enoil-ACP-redutase) (Hain, 2009; Lago, J. 2009).

O procedimento completo é dividido em três passos: extração do DNA a partir de material em cultura (meio sólido ou líquido) ou amostras clínicas descontaminadas, uma amplificação multiplex com primers biotinilados e uma hibridização reversa. A hibridização inclui a desnaturação química dos produtos de amplificação, hibridização dos amplicons, em cadeia única e marcados com biotina, a sondas ligadas à membrana, lavagem adstrigente, adição de um conjugado de streptavidina/fosfatase alcalina, e uma reação com produção de cor mediada pela fosfatase alcalina. Um modelo assegura uma interpretação fácil e rápida do padrão de bandas obtido (Hain, 2009).

7.5.2.4. Teste GenoType MTBDR_{sl} (second line)

O teste GenoType MTBDR_{sl} é baseado na tecnologia DNA-STRIP e permite a identificação genética molecular do MTC e da resistência às fluoroquinolonas (ofloxacina) e/ou aminoglicosídeos (capreomicina, canamicina, entre outros) e ao etambutol a partir de amostras em cultura ou amostras clínicas pulmonares com microscopia positiva. A identificação de resistência as fluoroquinolonas é detetada através de mutações do gene *gyrA* (que codifica uma DNA girase). Na detecção de resistência aos aminoglicosídeos são pesquisadas mutações nos genes 16S rRNA (*rrs*) e na resistência ao etambutol são pesquisadas mutações no gene *embB* (Hain, 2009).

O procedimento completo é dividido em três passos: extração do DNA a partir de material em cultura (meio sólido ou líquido) ou amostras clínicas descontaminadas, uma amplificação multiplex com primers biotinilados e uma hibridização reversa. A hibridização inclui a desnaturação química dos produtos de amplificação, hibridização dos amplicons, em cadeia única e marcados com biotina, a sondas ligadas à membrana,

lavagem adstrigente, adição de um conjugado de streptavidina/fosfatase alcalina, e uma reação com produção de cor mediada pela fosfatase alcalina. Um modelo assegura uma interpretação fácil e rápida do padrão de bandas obtido (Hain, 2009).

Nota: De salientar que todas as técnicas anteriormente descritas, assim como as guidelines da OMS seguidas no CHVNG/Espinho, não foram alteradas durante o período em estudo.

7.5.3. Técnicas para execução de perfis de suscetibilidade do MTC aos antimicrobianos de 2ª linha no INSA

7.5.3.1. Técnica utilizada de 2006 a 2010

Existem dois métodos que têm sido amplamente utilizados no teste de sensibilidade antimicobacteriana. O primeiro método, conhecido como Método da Proporção, utiliza Agar de Middlebrook 7H10. Este compara a contagem de colónias entre meios contendo fármacos e meios isentos de fármaco. A resistência a um fármaco é detetada quando uma percentagem de 1% ou mais da população bacteriana é resistente à concentração do fármaco testado. Normalmente, os resultados estão disponíveis após 21 dias de incubação. O segundo método, conhecido como método de sensibilidade radiométrica BACTEC 460TB, tem geralmente uma duração de 4 a 12 dias. Baseia-se na produção de dióxido de carbono radioativo marcado com ^{14}C por parte das micobactérias em desenvolvimento, o que se manifesta como um aumento do índice de crescimento no sistema (BD, 2009).

Historicamente, o procedimento do Método da Proporção (MOP) inclui o teste de sensibilidade do MT utilizando duas concentrações de antimicrobianos. O Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (Clinical and Laboratory Standards Institute, de CLSI, anteriormente NCCLS) continua a recomendar que o procedimento MOP inclua duas concentrações dos fármacos primários para o teste, exceto a rifampicina. Geralmente as concentrações baixas recomendadas para o procedimento MOP são concentrações críticas para estes fármacos (BD, 2009).

A concentração crítica é definida como a concentração de fármaco que permite a interpretação de um resultado como resistente ou sensível. Um isolado é determinado como resistente, se 1% ou mais da população-teste cresce na presença da concentração crítica do fármaco. Utiliza-se a concentração elevada do fármaco para obter um perfil do

grau de resistência dentro da população. Este resultado faculta informações ao médico para ajudar a determinar se é necessária modificação do regime terapêutico (BD, 2009).

7.5.3.2. Técnica utilizada de 2010 até à atualidade

As técnicas aqui utilizadas para os perfis de suscetibilidade aos antibióticos de 2ª linha são idênticas às técnicas utilizadas no CHVNG/Espinho para os antibióticos de 1ª linha. Aqui, para se testarem os antibióticos amicacina, capreomicina, etionamida, ofloxacina e ciprofloxacina, é utilizado o teste BACTEC MGIT 960 SIRE em meio líquido para os respectivos antibióticos. A técnica já está descrita anteriormente.

Para o PAS, cicloserina, canamicina é igualmente utilizado o método BACTEC MGIT 960 SIRE, mas é realizado em meio sólido de LJ.

Este meio sólido é produzido no laboratório com os componentes e concentrações que constam das Guidelines da OMS para a tuberculose. As concentrações dos antibióticos utilizados são os instituídos pela OMS para a realização da técnica.

8. RESULTADOS

8.1. Caracterização da amostra total

A amostra de 6092 pedidos de pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* corresponde a um total de 2459 pacientes com idades compreendidas entre os 0 e 95 anos, observadas entre 1 de Julho de 2006 e 30 de Junho de 2011. Esta amostra é composta por 39% de elementos do sexo feminino e 61% do sexo masculino.

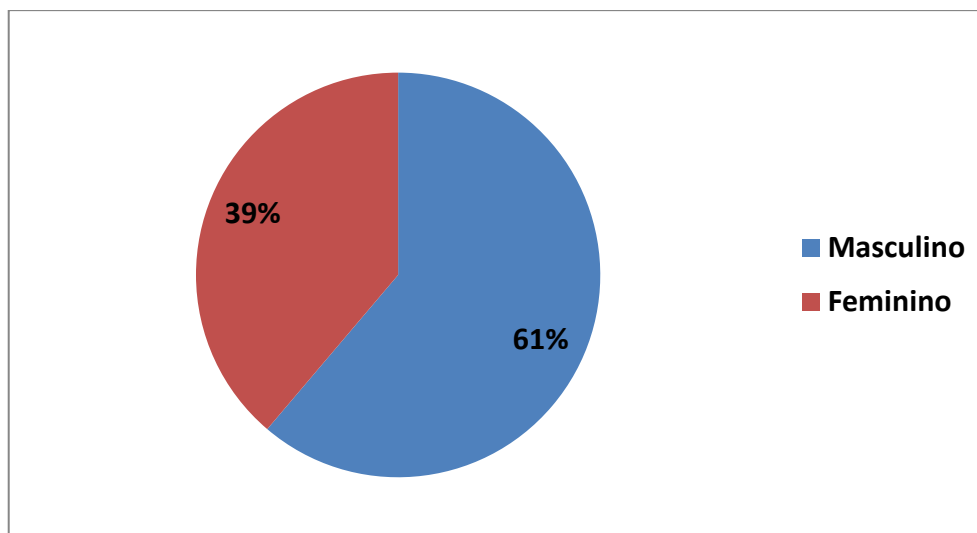


Gráfico 1 – Caracterização da amostra total por sexo

No gráfico seguinte podemos caracterizar o total das amostras estudadas, durante os 5 anos, por faixa etária.

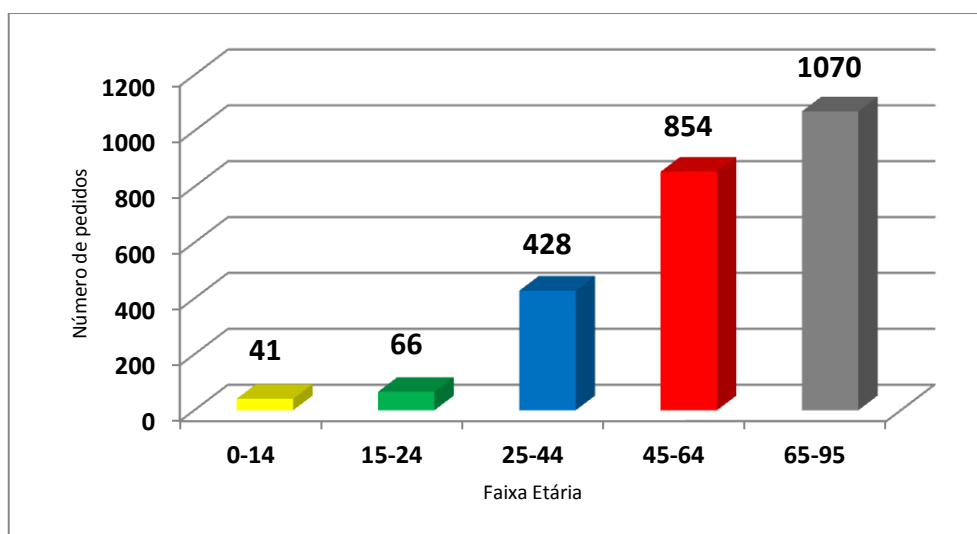


Gráfico 2 – Caracterização da amostra total por faixa etária.

Podemos concluir através da análise do gráfico anterior que a faixa etária com maior número de pedidos para pesquisa de MTC é dos 65 aos 95 anos, com 1070 pedidos. Segue-se a faixa etária dos 45 aos 64 anos com um total de 854 pedidos. Podemos de igual forma verificar que à medida que decresce a faixa etária, o número de pedidos para pesquisa de MTC também tende a diminuir exponencialmente, sendo a faixa etária dos 0 aos 14 anos a que apresenta menor número de pedidos (41). De salientar que as faixas etárias foram criadas de acordo com as orientações da DGS.

Destes 2459 pacientes, 132 (6%) revelaram culturas positivas para MTC, 57 casos (2%) de MNT e os restantes 2270 (92%) revelaram culturas negativas para micobactérias (Gráfico 3).

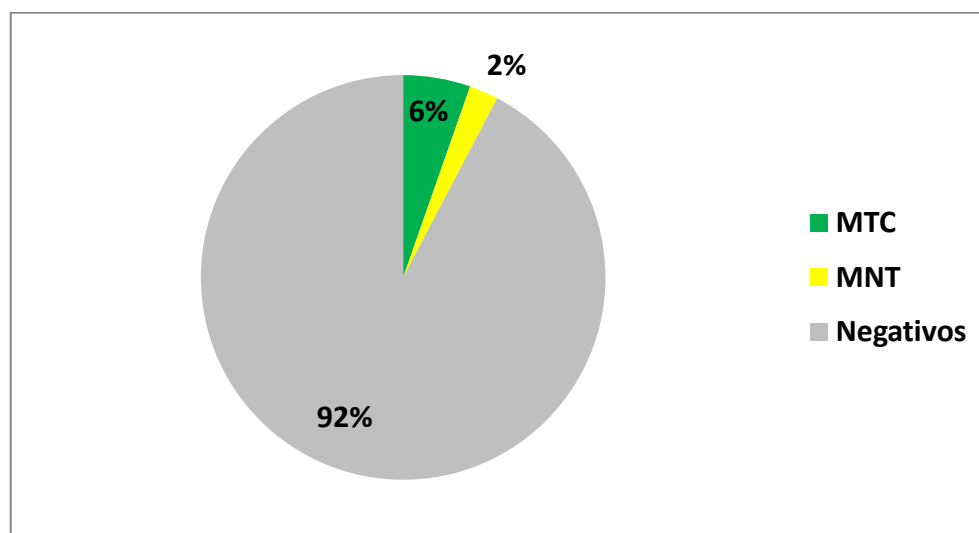


Gráfico 3 – Prevalência de resultados da amostra total.

Tal como podemos visualizar no gráfico seguinte, dos 189 pacientes com resultado positivo na pesquisa de micobactérias obteve-se um total de 70% de MTC (132 casos) e 30 % de MNT (57 casos).

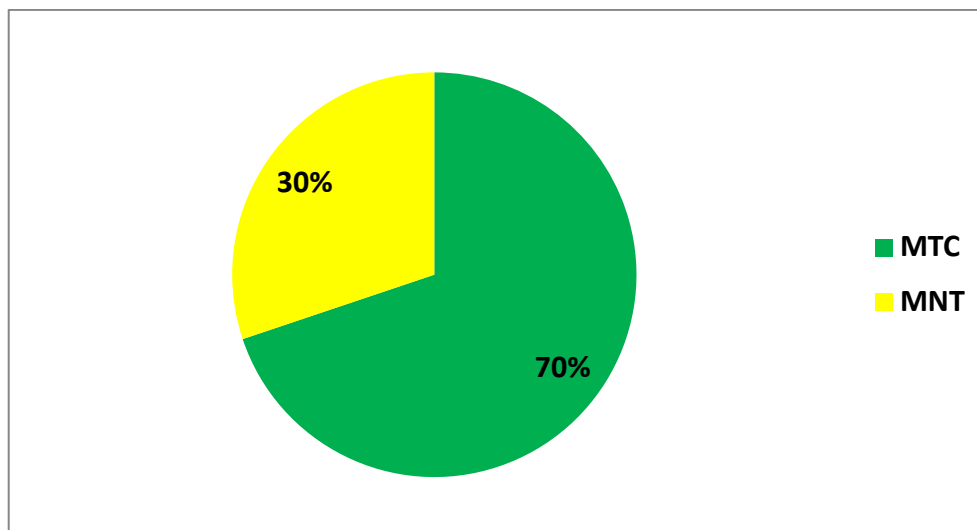


Gráfico 4 – Caracterização das amostras com resultado positivo.

Dos pacientes que apresentaram resultado positivo para pesquisa de micobactérias, podemos concluir através do gráfico seguinte, que 25% são do sexo feminino e 75% do sexo masculino.

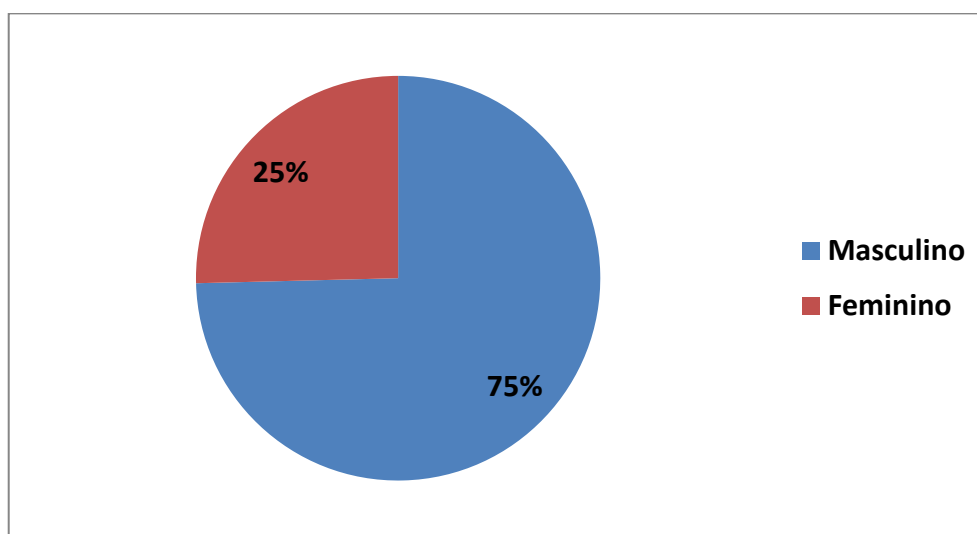


Gráfico 5 – Caracterização das amostras com resultado positivo por sexo.

8.2. Estudo estatístico de amostras de MNT

Neste estudo, a caracterização da amostra populacional de pacientes com resultados positivos para MNT é de 70% de elementos do sexo masculino e 30% de elementos do sexo feminino.

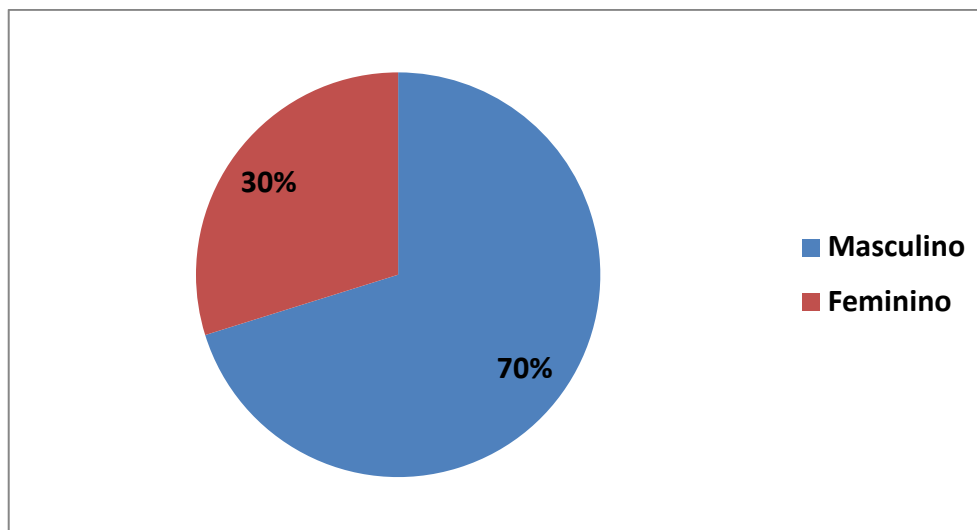


Gráfico 6 – Distribuição por sexo dos pacientes com MNT.

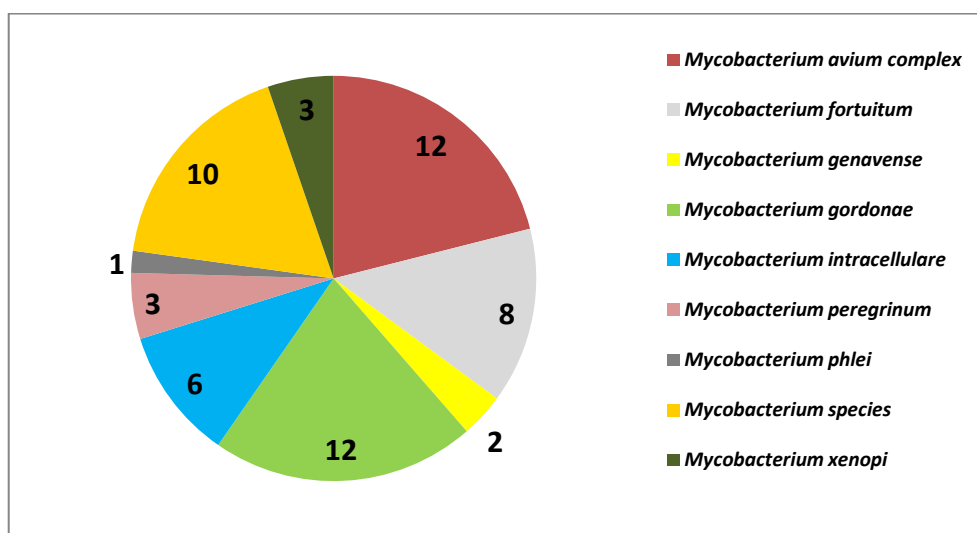


Gráfico 7 – Prevalência de MNT estudadas

Ao analisarmos o gráfico anterior podemos constatar que as espécies de MNT mais identificadas são o *Mycobacterium avium complex* e o *Mycobacterium gordonae*, com 12 casos demonstrados respetivamente. Segue-se o *Mycobacterium species* com 10 casos. O *Mycobacterium phlei*, com apenas 1 caso, foi a espécie de MNT menos identificada na nossa amostra em estudo.

No gráfico seguinte podemos comparar a prevalência de infeção por MNT entre sexos.

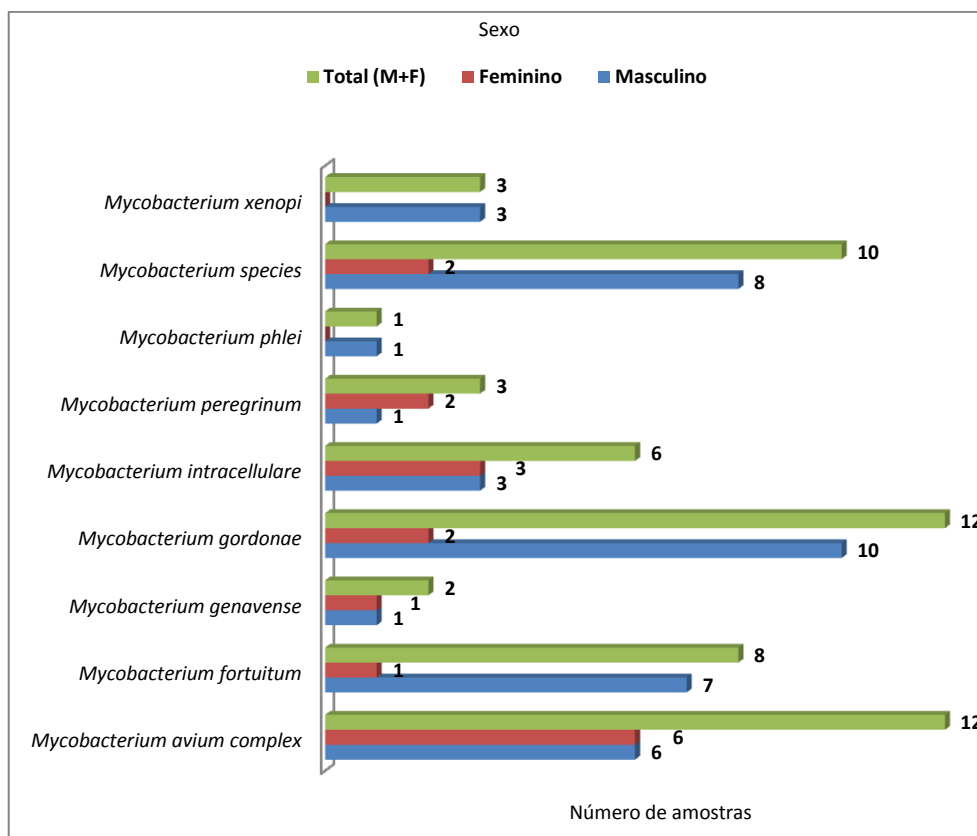


Gráfico 8 – Caracterização das MNT pesquisadas por sexo.

A prevalência de elementos do sexo masculino é notória, o que é justificado pelo gráfico de caracterização por sexo da população em que foram detetadas estirpes de MNT, assim como pelo gráfico de caracterização por sexo da amostra total estudada, que revela um número superior de pacientes do sexo masculino. O gráfico anterior permitiu-nos concluir que as MNT mais encontradas nas amostras biológicas dos pacientes foram o *Mycobacterium avium complex* e o *Mycobacterium gordonae* num total de 12 casos cada, assim como o *Mycobacterium species* com 10 casos estudados. De notar que apenas foi revelado um caso de *Mycobacterium phlei* no sexo masculino.

Na análise efetuada no gráfico seguinte, observamos a prevalência do número de casos por faixa etária.

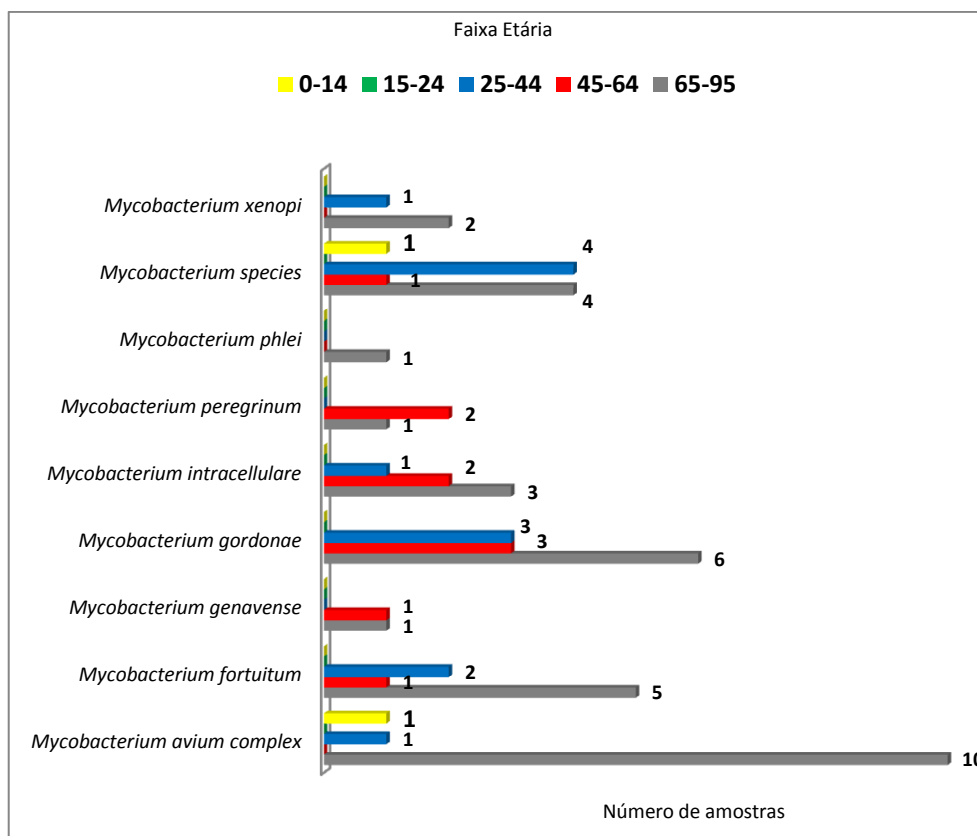


Gráfico 9 – Prevalência de casos de MNT por faixa etária

Através da análise deste gráfico, podemos concluir que a faixa etária que apresenta mais casos de MNT é dos 65 aos 95 anos (33 casos). No entanto, podemos salientar que apenas o *Mycobacterium peregrinum* apresenta mais casos de MNT dos 45 aos 64 anos, relativamente à faixa etária dos 65 aos 95 anos. Em igualdade de valores apenas temos que referir o mesmo número de casos para *Mycobacterium species* na faixa etária dos 25 aos 44 e 65 aos 95 anos, com 4 casos reportados em cada um deles; e para *Mycobacterium genavense*, com 1 caso tanto na faixa dos 45 aos 64 como na faixa dos 65 aos 95.

Deve ser realçado que o ano de 2006 e o ano de 2011 apenas contêm dados relativos a um semestre, uma vez que o início e fim de cada um destes é o mês de julho. Logo, o número de resultados positivos nestes anos seria inferior, devido à menor quantidade de amostras estudadas. Por este motivo, foram analisados, tanto para as MNT como para o MTC os anos efetivos de julho a junho e não de janeiro a dezembro como seria de esperar.

Na tabela seguinte podemos avaliar o número de casos de MNT por ano de estudo.

Ano de estudo	Número de casos
julho 2006 / junho 2007	17
julho 2007 / junho 2008	12
julho 2008 / junho 2009	6
julho 2009 / junho 2010	7
julho 2010 / junho 2011	15

Tabela 4 – Distribuição de MNT por ano de estudo.

Através da tabela anterior, podemos concluir que o ano que apresenta maior número de identificações de MNT é de julho de 2006 a junho de 2007, com 17 casos descritos. De julho de 2007 a junho de 2008 o número de casos identificados de MNT baixou para 12 e no ano seguinte para 6 casos. No entanto, a partir de julho de 2009 até junho de 2011, o número de casos voltou a aumentar atingindo no último ano do estudo 15 casos identificados.

Através do gráfico seguinte, podemos avaliar os casos de MNT por mês.

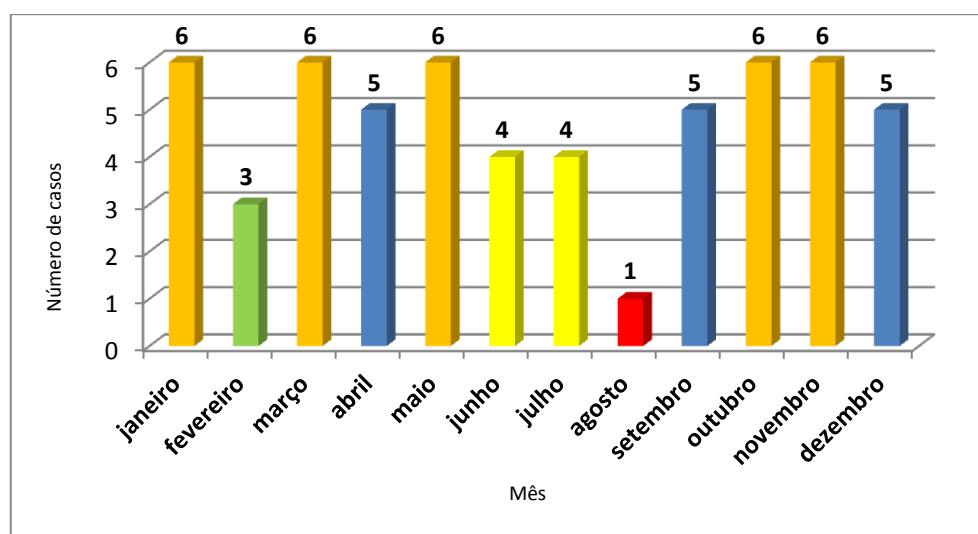


Gráfico 10 – Distribuição de MNT por mês.

Os meses onde foram identificados mais casos de MNT foram janeiro, março, maio, outubro e novembro, com 6 casos em cada. Seguidamente, foram identificados 5 casos em abril, setembro e dezembro. De salientar que agosto foi o mês com menos casos identificados de MNT, com apenas 1 caso descrito.

Uma vez que não foram executados perfis de suscetibilidade para as MNT encontradas nos pacientes em estudo, não foram executados os respectivos gráficos.

8.3. Análise estatística de amostras de MTC

Na caracterização da população-alvo podemos concluir, através do gráfico seguinte, que obtivemos 77% de elementos do sexo masculino e 23% de elementos do sexo feminino, estando de acordo com o gráfico de caracterização da amostra total que refere que a maioria dos pacientes deste estudo é do sexo masculino.

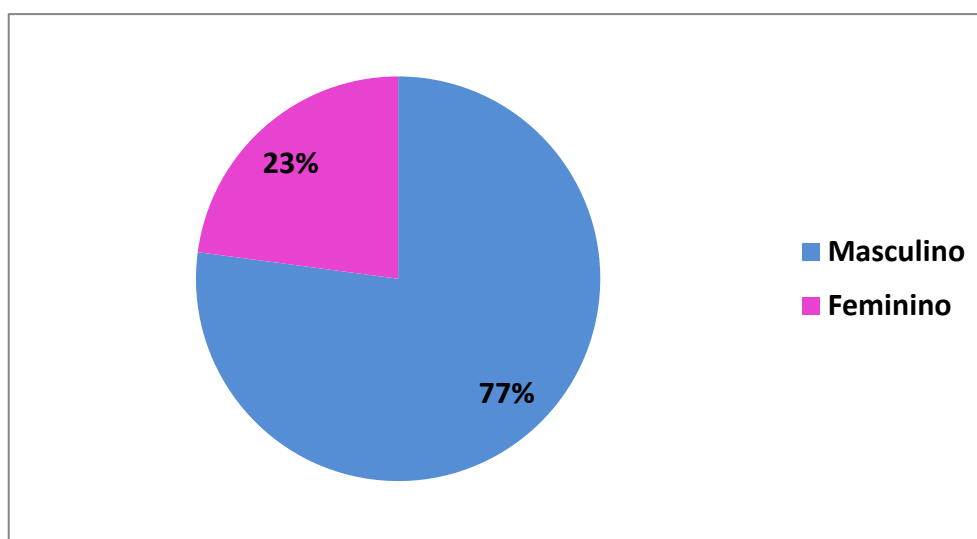


Gráfico 11 – Caracterização por sexo dos pacientes estudados para MTC.

De seguida, serão analisadas as prevalências dos pacientes por faixa etária. Como podemos visualizar no gráfico seguinte, todas as faixas etárias apresentam sempre um número superior de elementos do sexo masculino relativamente a elementos do sexo feminino, à exceção da faixa etária dos 0-14 anos, em que não existem pacientes do sexo masculino, apenas dois do sexo feminino.

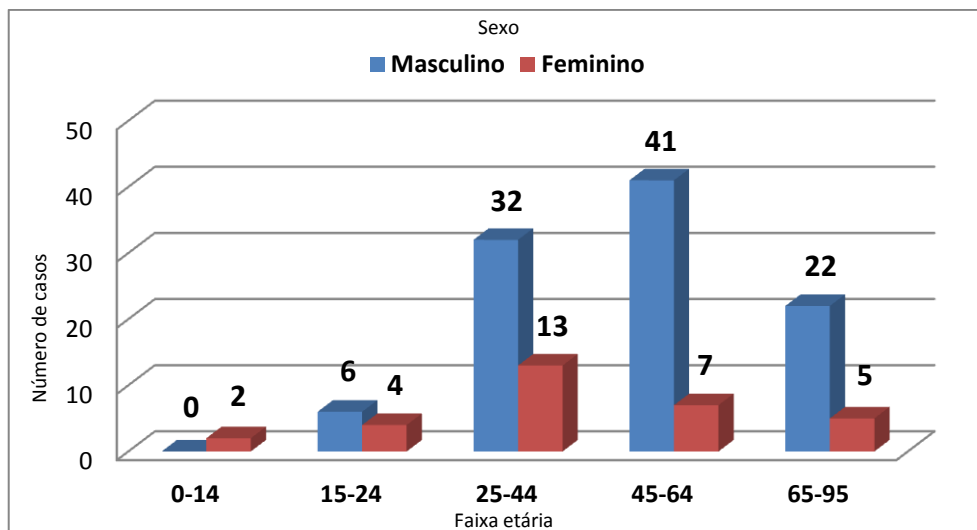


Gráfico 12 – Caracterização dos pacientes com MTC por sexo e faixa etária.

As faixas etárias onde a diferença entre os sexos é mais acentuada são entre os 25-44 (2,46 vezes mais elementos do sexo masculino do que elementos do sexo feminino), 45-64 (5,86 vezes mais), e 65-95 anos (4,4 vezes mais). Nestas faixas etárias a prevalência de elementos do sexo masculino é então muito superior aos elementos do sexo feminino.

Na análise do gráfico seguinte, podemos visualizar a percentagem de prevalência de casos de tuberculose identificados como positivos, por faixa etária. A faixa etária com maior prevalência de estirpes de MTC é entre os 45 e 64 anos, com 48 casos identificados. A faixa etária imediatamente inferior (25-44 anos) apresenta um valor de 45 casos. A faixa etária onde são apresentados menos casos de tuberculose é entre os 0-14 anos, com apenas 2 casos descritos.

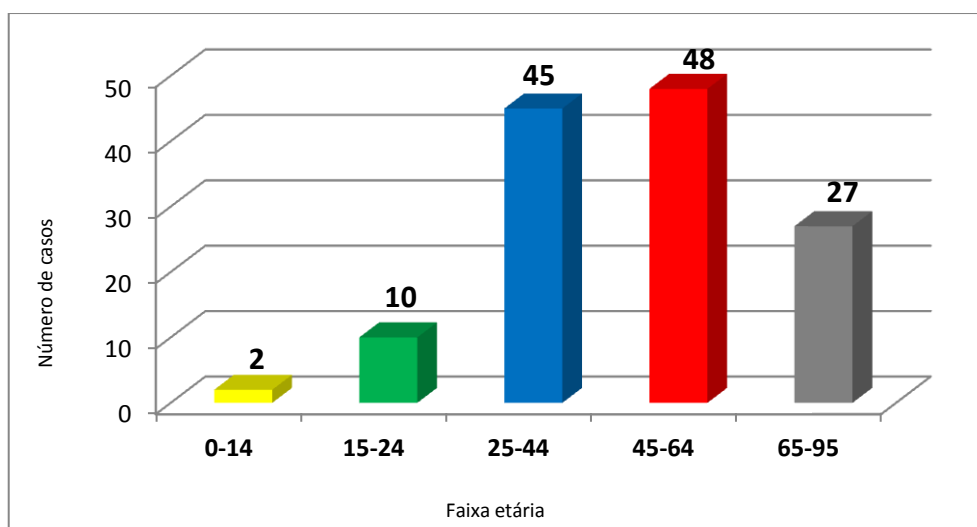


Gráfico 13 – Distribuição de estirpes de MTC, estudadas por faixa etária.

Ao realizar este estudo por um período de 5 anos (1 julho de 2006 a 30 de junho de 2011), para a obtenção de resultados com melhor significado estatístico, será importante o estudo de estirpes positivas por ano, no sentido de se perceber se eventualmente existe uma variação (decréscimo ou aumento entre anos) durante o período em estudo.

Ano de estudo	Número de casos
julho 2006 / junho 2007	25
julho 2007 / junho 2008	22
julho 2008 / junho 2009	20
julho 2009 / junho 2010	25
julho 2010 / junho 2011	40

Tabela 5 – Distribuição do número de amostras estudadas por ano de estudo.

Ao analisarmos a tabela anterior, pode-se concluir que o ano de julho de 2008 a junho de 2009 foi o que apresentou menor número de casos de identificação positiva para MTC, com 20 identificações. Seguidamente, o ano de julho de 2007 a junho de 2008 revela 22 amostras positivas. Os anos de julho de 2006 a junho de 2007, e de julho de 2009 a junho de 2010 revelaram 25 casos de MTC respetivamente. O último ano de estudo, de julho de 2010 a junho de 2011 apresentou o maior número de casos positivos para tuberculose, com 40 casos estudados.

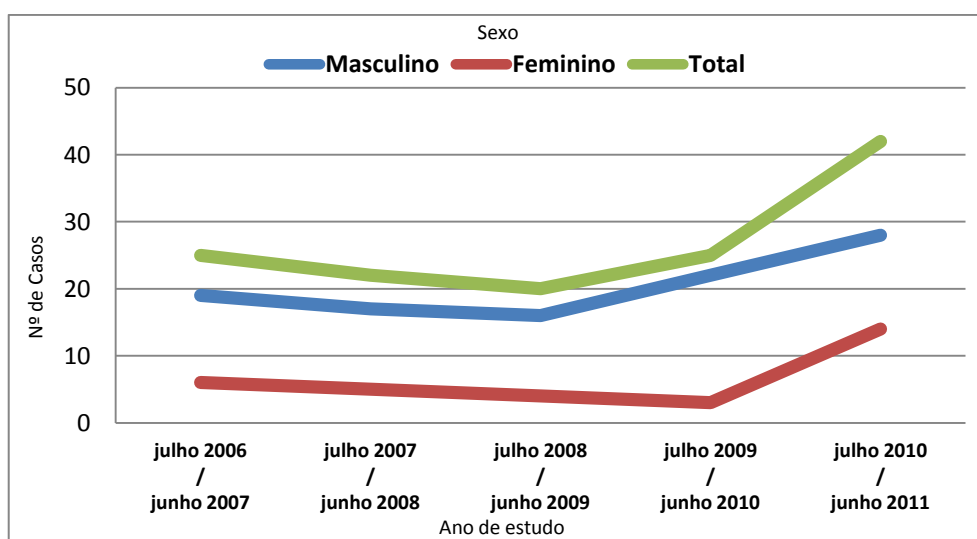


Gráfico 14 – Relação entre número de casos, ano e sexo de amostras de MTC.

Ao analisarmos o gráfico anterior, verificamos que, nos primeiros 3 anos de estudo (julho de 2006 a junho de 2009), o número de casos por sexo foram diminuindo na mesma proporção. A partir de julho de 2009 denota-se o início de um aumento progressivo, que atinge os valores mais altos do número de casos de tuberculose identificados no ano de julho de 2010 a junho de 2011. Esta situação poderá também ser justificada pelo aumento da população abrangida pelo CHEDV a partir de 2009 com a formação do centro hospitalar e consequente junção com mais dois hospitais, o que aumentou significativamente a população estudada.

No gráfico seguinte, podemos analisar a prevalência de amostras positivas por mês de colheita.

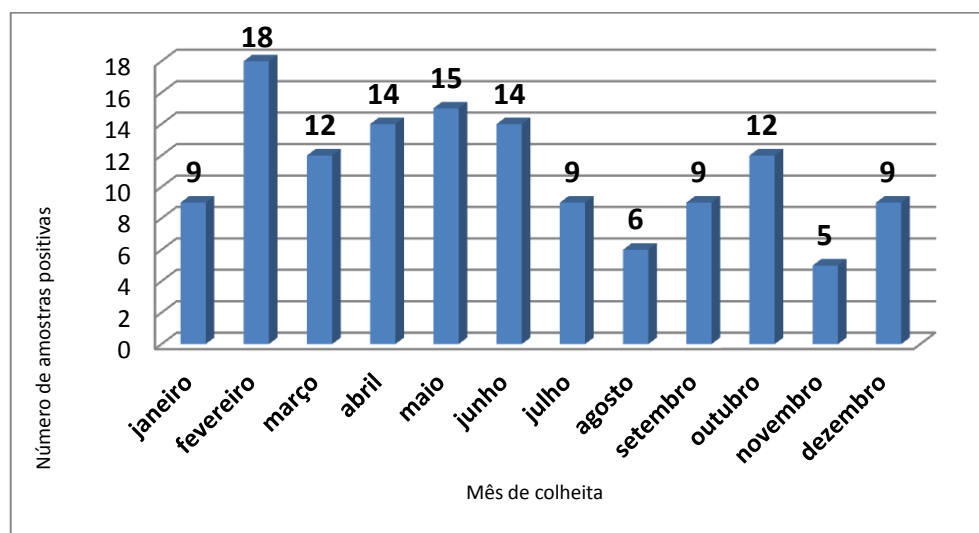


Gráfico 15 – Distribuição de amostras positivas para MTC por mês de colheita.

Ao analisarmos o gráfico podemos constatar que o mês com maior prevalência de casos de tuberculose positivos é o mês de fevereiro, com 18 casos. Segue-se o mês de maio (15), abril e junho (14), março e outubro (12) com o maior número de amostras positivas. O mês em que foi registado o menor número de casos positivos foi o mês de novembro, com apenas 5 casos.

De seguida foi estudada a prevalência de estirpes de tuberculose detetadas por amostra biológica. Ao analisarmos o gráfico, são notórios os 66 casos de amostras positivas no produto “espito 1ª amostra”. Este resultado é o esperado, uma vez que sendo a tuberculose tipicamente uma doença pulmonar, é natural que sejam normalmente solicitadas a priori análises neste produto biológico.

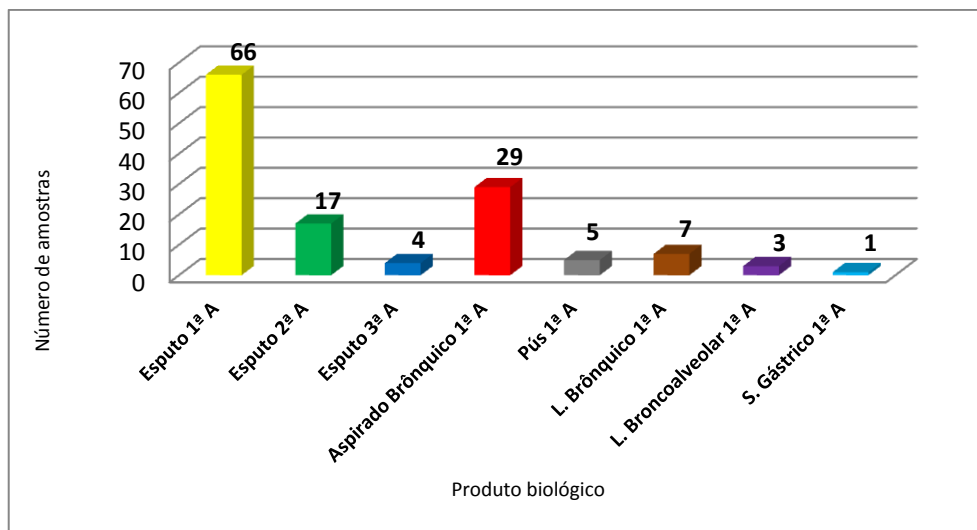


Gráfico 16 – Distribuição de estirpes de MTC por produto biológico.

O aspirado brônquico revela-se como sendo o segundo produto biológico com mais identificações de tuberculose, 29 casos e o suco gástrico apresenta-se como o produto com menor número de identificações (apenas com 1 caso reportado). Refere-se a um elemento do sexo masculino na faixa etária dos 25 aos 44 anos.

A análise de prevalência de tuberculose por serviço também se revela importante neste estudo. Como esperado, e tal como podemos visualizar no gráfico seguinte, os serviços com maior percentagem de casos identificados são o internamento e consulta de pneumologia, com 36% e 28% respetivamente.

Foram detetados 9% de casos no serviço de urgência, provavelmente sendo originários de pacientes que, apresentando a sintomatologia associada a uma infeção por tuberculose, e após um diagnóstico radiológico que orientava o clínico nesse sentido, foram solicitadas análises de pesquisa de MTC através do serviço de urgência.

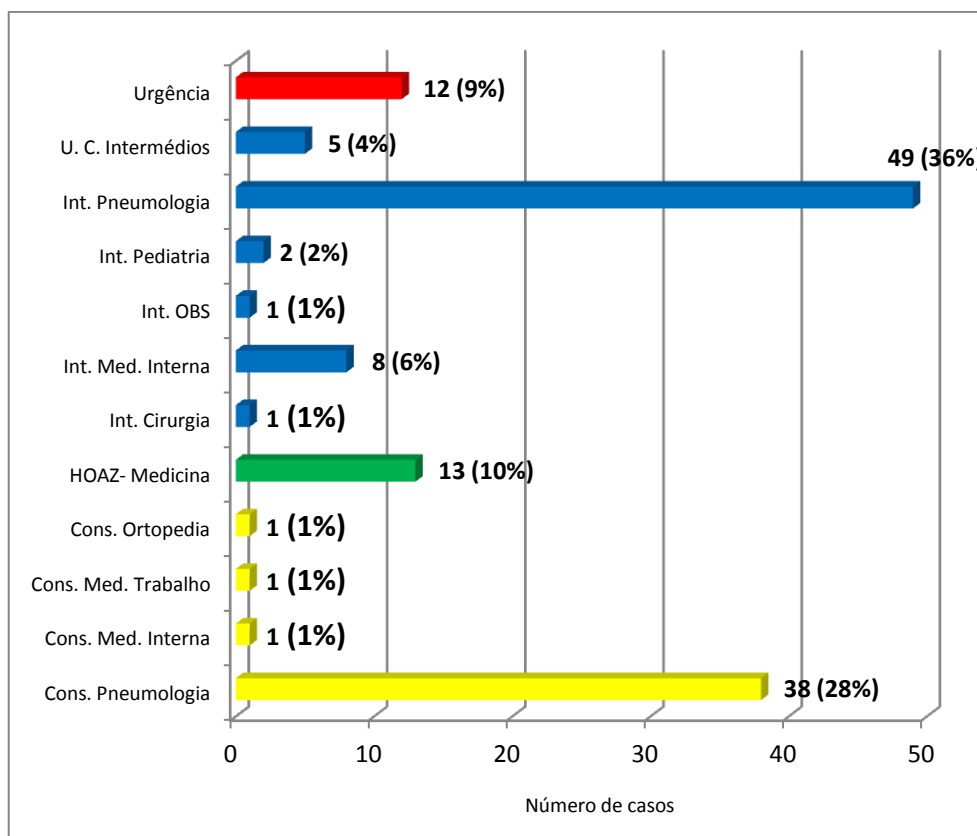


Gráfico 17 – Distribuição de estirpes de MTC por proveniência de serviço hospitalar.

Através da análise do gráfico anterior podemos verificar que 10% das amostras positivas estudadas são provenientes do Internamento de Medicina do Hospital de Oliveira de Azeméis. As amostras provenientes de serviços onde tipicamente não são detetados casos de tuberculose apresentam baixas percentagens de prevalência. É o caso dos serviços de consulta de medicina interna, medicina do trabalho e ortopedia com 1% de casos cada, e os serviços de internamento em observação e cirurgia com a mesma percentagem.

Sendo a base de estudo deste trabalho o estudo do perfil de suscetibilidade do MTC aos antibióticos, torna-se imprescindível a análise de resultados dos perfis obtidos em todos os doentes testados.

No Gráfico 18 podemos verificar os perfis de suscetibilidade do MTC aos antibióticos de 1ª linha.

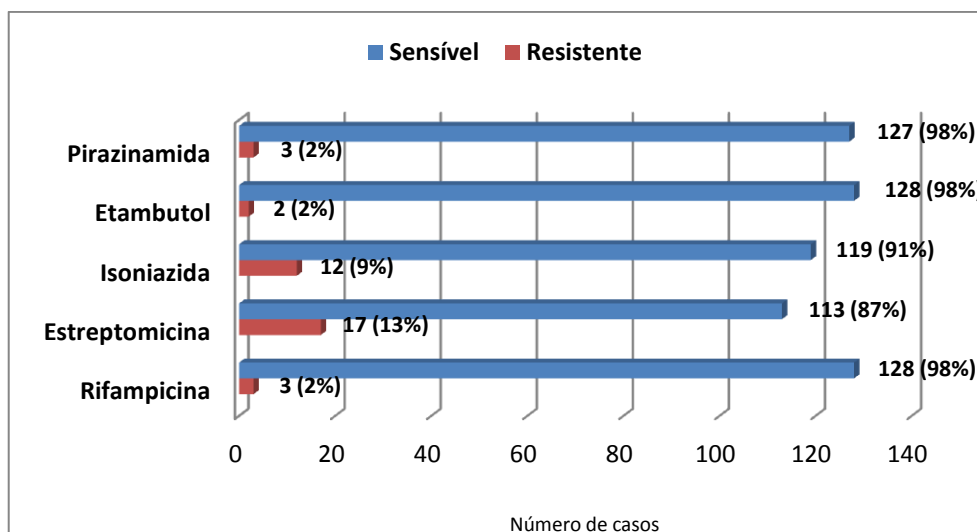


Gráfico 18 – Perfil de suscetibilidade aos antibióticos de 1ª linha nas amostras de MTC.

Através da análise do gráfico podemos concluir que obtivemos 127 (98%) amostras sensíveis para a pirazinamida e 3 (2%) amostras resistentes. Para o etambutol, foram detetadas 128 (98%) sensibilidades e 2 (2%) resistências. Para a estreptomicina foram detetadas 113 (87%) perfis suscetíveis e 17 (13%) estirpes resistentes. De notar que no somatório de casos para cada um dos antibióticos anteriormente testados, apenas resulta um total de 130 pacientes. Isto deve-se ao facto de a um dos pacientes em estudo apenas ter sido realizado o antibiograma à rifampicina e isoniazida, por biologia molecular, devido à reduzida quantidade de amostra disponível para realização do antibiograma completo. Em relação à isoniazida obtivemos um total de 119 (91%) amostras sensíveis para um total de 12 (9%) resistentes e para a rifampicina, observamos um total de 128 (98%) amostras sensíveis para 3 (2%) amostras resistentes.

O gráfico seguinte apresenta uma estatística de todos os perfis de suscetibilidade dos pacientes estudados.

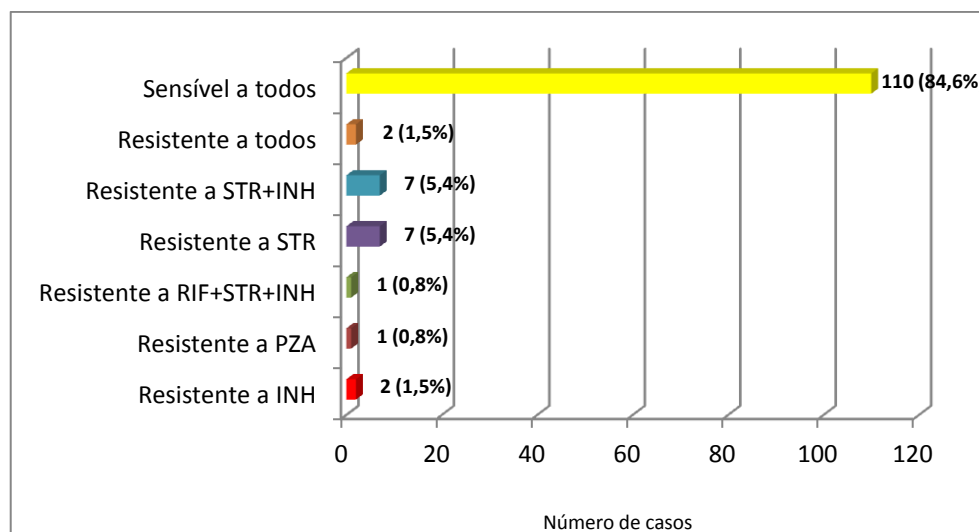


Gráfico 19 – Perfis de suscetibilidade do MTC em todos os pacientes.

Podemos salientar que a grande maioria destes pacientes (110) apresentaram sensibilidade a todos os fármacos de 1ª linha. Este é um perfil importante, no sentido de melhor combater a doença, orientado para a cura, e caso o tratamento seja seguido de forma orientada e consciente, diminui o número de possíveis resistências que possam vir a ser criadas.

Apenas 3 casos de MDR-TB foram detetados neste estudo. O primeiro caso apresenta resistência a todos os fármacos de 1ª linha, mas sensibilidade a todos os fármacos de 2ª linha. Foram testados e administrados todos os fármacos de 2ª linha disponíveis (amicanica, capreomicina, etionamida, ofloxacina, canamicina, cicloserina e PAS). Este é um paciente portador de Hepatite C, ex-toxicodependente, alcoólatra, e cazaquistânês, ou seja, apresenta fatores de risco associados para a infecção por tuberculose e para a multirresistência. O segundo caso, apresenta-se como resistente a todos os antibióticos de 1ª linha, resistência à capreomicina, canamicina e amicacina, no entanto, não é resistente às fluoroquinolonas, o que leva a excluir tratar-se de um caso de XDR-TB. A este paciente foi administrado linezolid, etionamida, clofazimina, D-cicloserina, ofloxacina e PAS, aos quais o antibiograma se revelou sensível. Trata-se de um paciente com história de alcoolismo grave e depressão profunda por morte de familiar, que levou ao abandono do tratamento várias vezes, daí o emergir das multirresistências. No entanto, veio a falecer alguns meses após o tratamento ter negativado as culturas de controlo de terapêutica. O terceiro caso é um paciente que apresenta resistência à INH, RIF e STR mas sensibilidade à PZA e EMB. Apresenta igualmente resistência a todos os antibióticos de 2ª linha, com exceção da D-cicloserina e do PAS. Foram administrados a

este paciente PZA+EMB+D-cicloserina+PAS. Este paciente apresentava um quadro clínico de DPOC e silicose. Durante o estudo, concluímos que os 3 pacientes com tuberculose multirresistente já faleceram.

No estudo obtivemos 7 casos de resistência à isoniazida e estreptomicina, o que não indica casos de MDR-TB. Para que seja considerado MDR-TB, terá que ser resistente à rifampicina e isoniazida em simultâneo. A resistência isolada a fármacos de 1ª linha também foi detetada, à pirazinamida (1 caso), isoniazida (2) e estreptomicina (7).

De seguida iremos analisar os gráficos de perfil de sensibilidade e resistência de todos os antibióticos de 1ª linha, ao longo dos 5 anos de estudo.

Em relação à rifampicina, podemos verificar, através do gráfico seguinte, que nos dois primeiros anos de estudo esta apresentava 100% de sensibilidade às estirpes de MTC identificadas nos pacientes. No ano de 2008-2009, observou-se um decréscimo para 90% de sensibilidades. Em 2009-2010 obteve-se novamente 100% de sensibilidade, voltando a diminuir para 97% em 2010-2011.

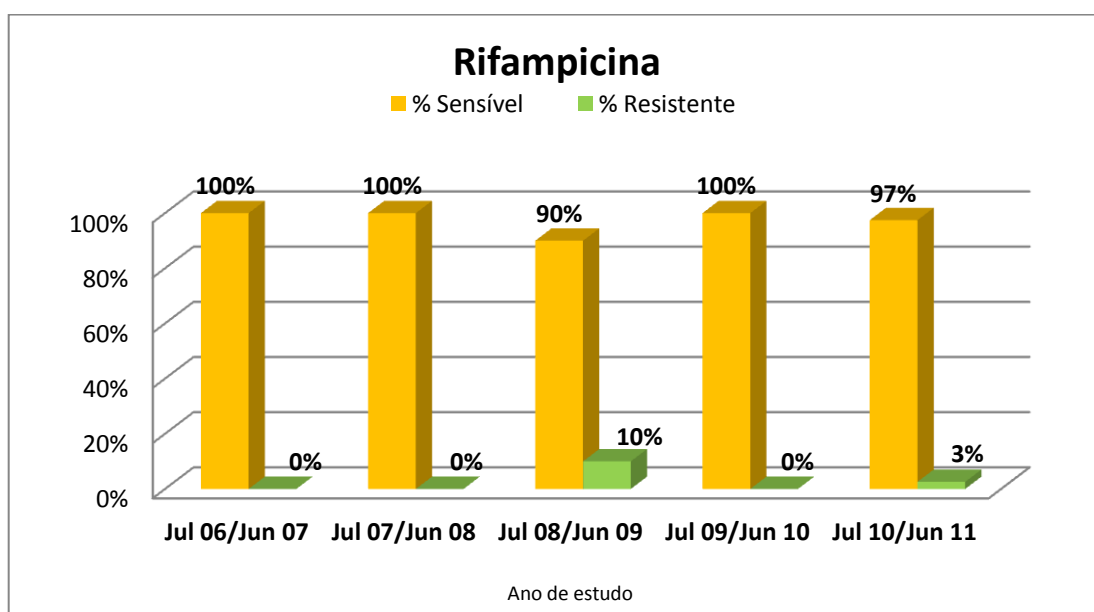


Gráfico 20 – Perfil de suscetibilidade à rifampicina durante os 5 anos de estudo.

Ao analisarmos o Gráfico 21, podemos verificar de forma inequívoca que a isoniazida nunca obteve nos anos em estudo perfis de 100% de sensibilidade do MTC. Podemos observar que no ano de 2006-2007 obteve-se uma sensibilidade de 92% à isoniazida nos pacientes estudados. Em 2007-2008 houve um ligeiro decréscimo de sensibilidade para 91%. Em 2008-2009 denotam-se os níveis mais baixos de sensibilidade à isoniazida, com

80% de sensibilidade. De 2009-2010 denota-se um aumento da sensibilidade para 92%, sendo que o último ano do estudo apresenta os níveis mais elevados de suscetibilidade das estirpes de MTC à isoniazida em 95% dos casos.

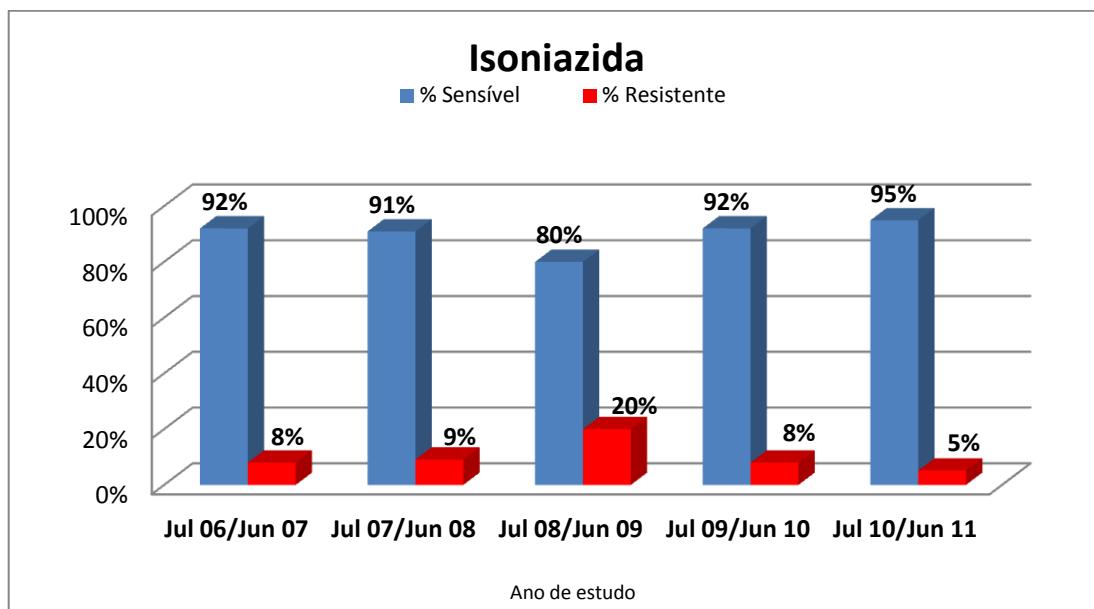


Gráfico 21 – Perfil de suscetibilidade à isoniazida durante os 5 anos de estudo.

Relativamente à estreptomicina, e através da análise do gráfico seguinte, podemos concluir que as sensibilidades foram variando ao longo dos anos de estudo. O ano de 2006-2007 foi o que apresentou valores mais baixos de sensibilidade à estreptomicina com 76% de casos de MTC sensíveis a este antibiótico. Posteriormente, em 2007-2008, podemos verificar que foi o ano que apresentou níveis mais elevados de sensibilidade à estreptomicina, com 95% de casos suscetíveis. Denota-se um decréscimo nas sensibilidades em 2008-2009 com 80% de casos de MTC sensíveis a este fármaco. Em 2009-2010 as sensibilidades à estreptomicina voltam a aumentar para 88% e em 2010-2011 verifica-se 92% de estirpes sensíveis à estreptomicina.

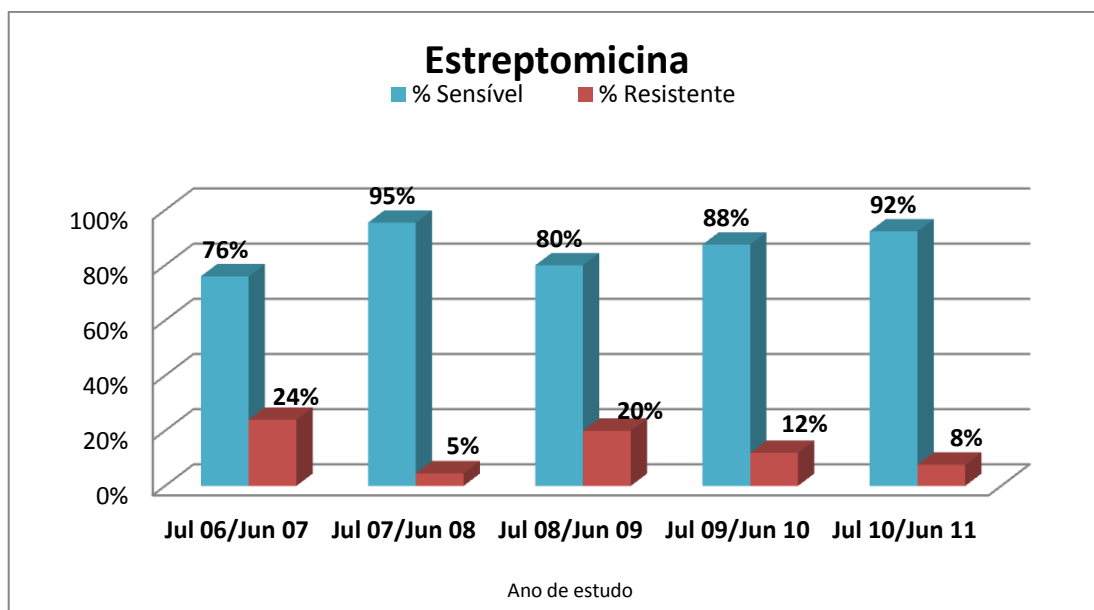


Gráfico 22 – Perfil de suscetibilidade à estreptomicina durante os 5 anos de estudo.

Na análise do Gráfico 23, podemos verificar que em 3 anos de estudo foram identificados perfis de suscetibilidade de 100% de sensibilidade ao etambutol (2006-2007, 2007-2008 e 2009-2010). Em 2008-2009 pode-se observar que existiram 95% de sensibilidades a este fármaco. No último ano do estudo foram identificados 97% de casos de MTC sensíveis ao etambutol.

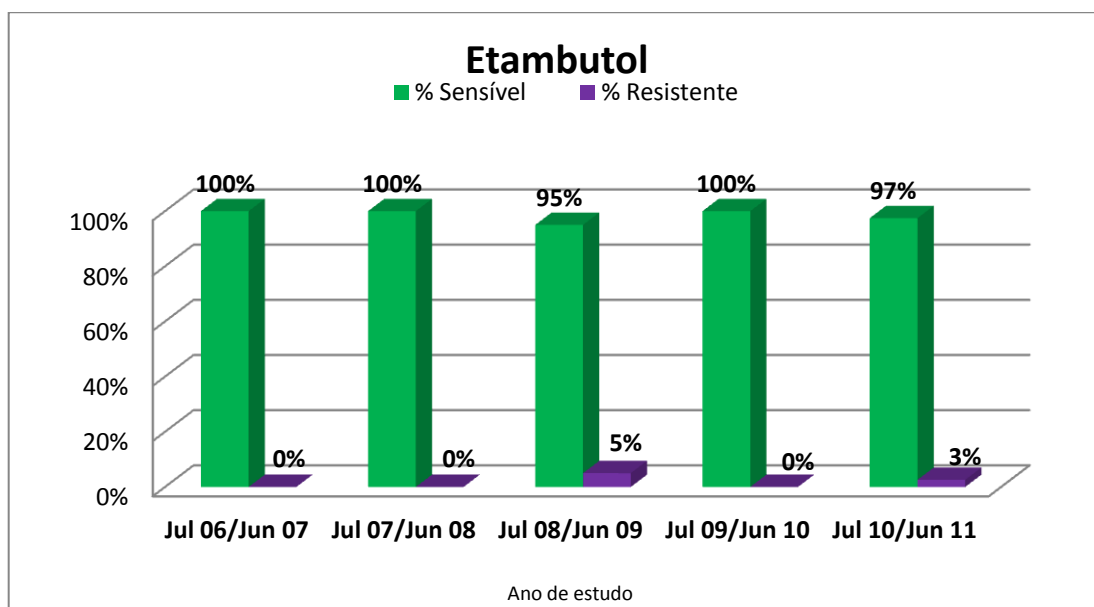


Gráfico 23 – Perfil de suscetibilidade ao etambutol durante os 5 anos do estudo.

Na análise do gráfico seguinte podemos verificar que, tal como o etambutol, a pirazinamida apresentou em 3 anos de estudo perfis de suscetibilidade de 100% de sensibilidade à pirazinamida (2006-2007, 2007-2008 e 2009-2010). Em 2008-2009 e 2010-2011 obtiveram-se 95% de estirpes sensíveis à pirazinamida.

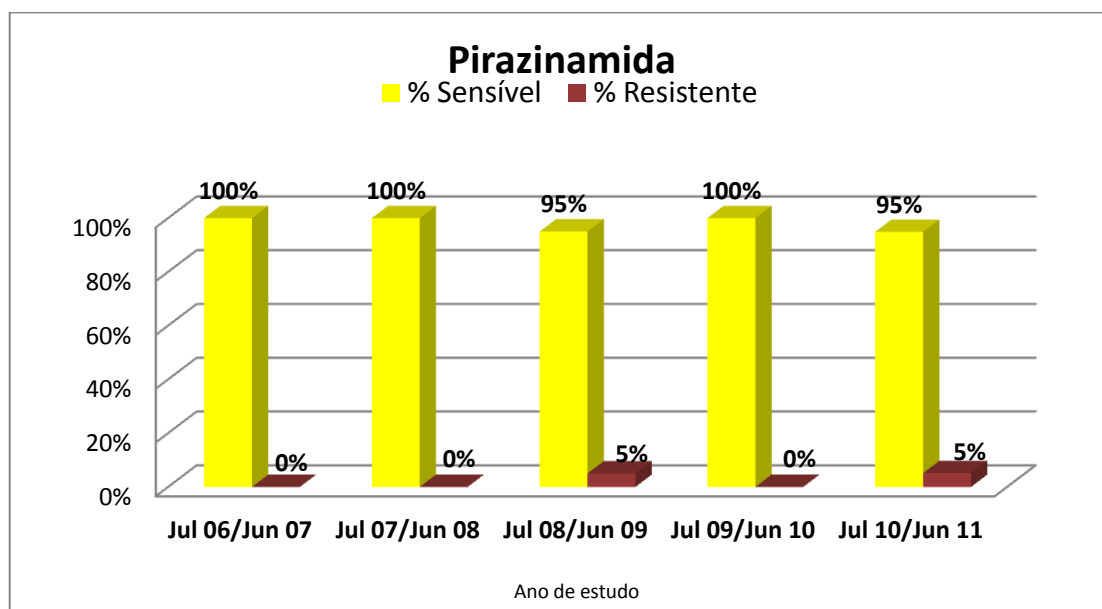


Gráfico 24 – Perfil de suscetibilidade à pirazinamida durante os 5 anos de estudo.

Em última análise, podemos verificar através do gráfico seguinte que a crescente preocupação dos clínicos relativamente às coinfeções tuberculose-HIV não se traduzem na nossa amostra populacional, uma vez que, se verificarmos no gráfico, tanto nos pacientes onde foram identificadas MNT como MTC, maioritariamente não foi solicitado o pedido de análise de HIV, com 74% sem pedido de HIV para os pacientes com MNT e 58% sem pedido para pacientes com MTC. Podemos também verificar que os 40% e 26% de pedidos de análise de HIV para MTC e MNT respetivamente, se traduzem num resultado negativo. Apenas 2% (2 casos) de pedido de HIV para os pacientes com identificação de MTC originaram um resultado positivo.

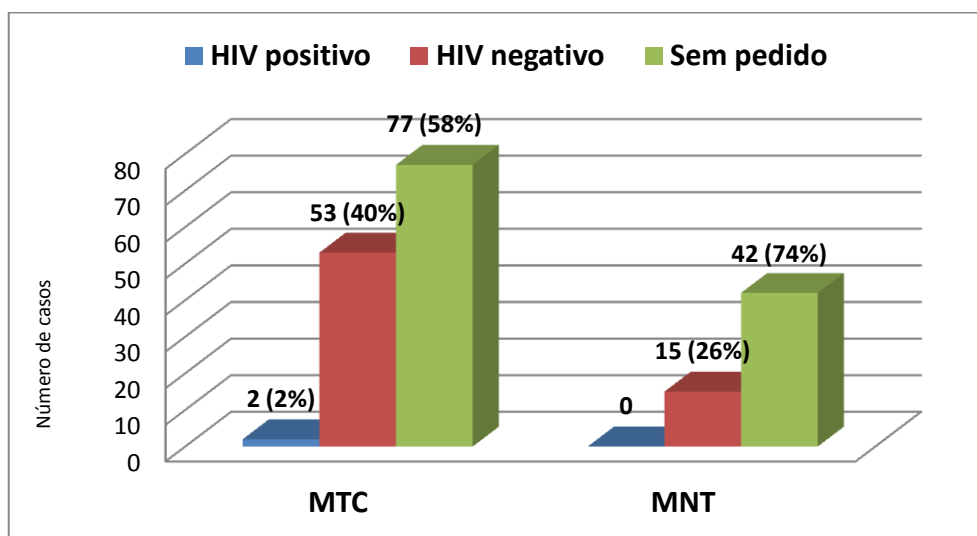


Gráfico 25 – Prevalência de casos de HIV com MNT e MTC.

9. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Através de diversos estudos, podemos concluir que são vários os fatores que contribuem para o desenvolvimento e disseminação de resistência aos fármacos antituberculosos. A maior parte deles são provocados pelo Homem, tais como:

- Tratamentos prévios inadequados ou incompletos, quer por má adesão do doente à terapêutica, erros médicos e/ou desorganização dos serviços de luta contra a tuberculose;
- Atrasos no diagnóstico da multirresistência, que expõem os doentes por longos períodos de tempo a esquemas terapêuticos ineficazes, aumentando a probabilidade de desenvolvimento de resistências e prolongando os intervalos de infeciosidade com maior transmissão de estirpes resistentes na comunidade;
- A infeção com HIV, além de encurtar o período de evolução entre a infeção e a doença, cria um conjunto importante de indivíduos imunodeprimidos e de maior suscetibilidade a serem infetados com tuberculose;
- O uso indiscriminado de antibióticos de 2ª linha, como as fluoroquinolonas, para o tratamento de outras infeções, levando a que o organismo crie mecanismos de resistência aos fármacos, impedindo a sua atuação numa infeção posterior por tuberculose;
- Infeção nosocomial da doença, particularmente importante nos países em desenvolvimento, onde o isolamento dos pacientes é dificultado pelo crescente número de casos da doença.

Ao analisarmos os nossos resultados, relativamente aos dados de MNT obtidos, verificamos que da nossa amostra total, em 30% dos pacientes analisados foram identificadas MNT. O diagnóstico de MNT requer muita atenção, pois muitas vezes, se isoladas em amostras clínicas não estéreis, podem significar colonização transitória ou contaminação.

Relativamente ao sexo, é notório que a maioria dos pacientes é do sexo masculino, com 70% dos casos, sendo 30% do sexo feminino. De facto, as MNT mais patogénicas e mais vezes isoladas são as *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. gordonae*, segundo estudos de Álvares, Ferreira, Forbes, entre outros. Se verificarmos no nosso estudo, de facto foram identificadas 12 amostras positivas para *M. avium* e *M. gordonae* respetivamente. Os anos que apresentaram maior prevalência de casos de MNT foram o primeiro e o último

ano do estudo, com 17 e 15 casos respetivamente. De salientar a semelhança no aumento do número de casos em 2010-2011 tanto para as MNT como para o MTC.

Uma vez que o tratamento das MNT depende da espécie envolvida, da extensão e forma de apresentação da doença, do perfil de sensibilidade aos fármacos e da condição clínica do doente, não foram realizados os antibiogramas nas identificações de MNT. Uma das formas de tratamento poderá ser a cirurgia, que apenas será realizada se a doença estiver localizada, sendo refratária à terapêutica médica (Álvares, E. 2009; Ferreira, W. et al 2000; Jawetz et al, 2005; Mandell, G. et al 2005; Murray, P. et al 2003).

Em relação ao MTC, de salientar que com a fusão dos hospitais de Oliveira de Azeméis, Feira e S. João da Madeira, com a criação do CHEDV, a sua pesquisa nas mais diversas amostras biológicas é dirigida à Unidade da Feira para a sua execução. Daí que surjam no gráfico nº 17 de distribuição de amostras por serviço requisitante 10% de amostras relativas ao Internamento de Medicina do Hospital de Oliveira de Azeméis. As amostras provenientes de serviços onde tipicamente não são detetados casos de tuberculose apresentam baixas percentagens de prevalência. É o caso dos serviços de consulta de medicina interna, medicina do trabalho e ortopedia, com 1% de casos em cada serviço, e os serviços de internamento em observação e pediatria com a mesma percentagem.

Na análise do número de casos ao longo dos meses, pode-se verificar que os meses com menos casos de tuberculose pulmonar notificados pela DGS foram novembro e dezembro. Se compararmos com o nosso estudo, podemos concluir que, também neste, os meses de novembro e dezembro, para além do mês de agosto, representam os meses com menor número de casos de MTC.

Foram publicados pela ARS-NORTE, em Setembro de 2011, os dados relativos a um estudo estatístico através do Programa de Luta contra a Tuberculose (PNT). Nestes constam informações fornecidas pelo Sistema de Vigilância da Tuberculose (SVIG-TB) da DGS, para o período de 2000 a 2010, dados de mortalidade por tuberculose da DGS e do Instituto Nacional de Estatística (INE), para o período de 2001 a 2009, e dados do Sistema de notificação laboratorial dos TSA de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*, para o período 2008 a 2010.

Através deste documento podemos observar que em 2010 foram registados no SVIG-TB 1017 casos de tuberculose, incidentes na região de saúde do Norte, dos quais 933 novos casos e 84 retratamentos. Neste estudo o maior decréscimo de casos de tuberculose ocorreu em 2009, com menos 9% de casos reportados, sendo que nesta região, de 2000 a 2010, observou-se um decréscimo anual médio de 6,1%. De facto, ao compararmos o

nosso estudo com o reportado pela ARS, confirma-se que o ano de 2009 apresentou menos casos de tuberculose. No entanto, no nosso estudo, o ano com mais prevalências de tuberculose foi 2010-2011, talvez justificado pelo acréscimo da população abrangida pelo CHEDV, o que já não consta no triênio de estudo efetuado pela ARS.

Ainda no estudo da ARS, registou-se de 2000 a 2010 um total de 15130 casos de tuberculose em que 68,7% dos casos pertencem a pacientes do sexo masculino e 31,3% do sexo feminino. No entanto, ao longo dos anos observou-se um decréscimo no número de casos em ambos os sexos. Se verificarmos também no nosso estudo, a prevalência de casos de tuberculose no sexo masculino é superior à do sexo feminino (77% para o sexo masculino e 23% para o sexo feminino).

Segundo este documento da ARS, em 2010 a tuberculose atingiu maioritariamente o grupo etário com idades compreendidas entre os 35-44 anos. À exceção do grupo etário com mais de 74 anos, verificou-se um decréscimo no número de novos casos nas outras faixas etárias, nomeadamente na compreendida entre os 0 e 14 anos. Ao compararmos com o nosso estudo, podemos confirmar que a faixa etária dos 35 aos 44 anos foi das mais prevalentes nos casos de MTC. No entanto, a que apresentou maior prevalência foi a dos 45 aos 64 anos. Mandell e seus colaboradores referem no seu estudo que a faixa etária mais prevalente para casos de infeção por micobactérias é a dos idosos, ou seja, idade superior a 65 anos.

No presente estudo estatístico de MTC, está incluído um caso em que o agente infeccioso foi o BCG. Trata-se de uma criança do sexo feminino de cerca de 3 meses, que teve uma complicação decorrente da vacinação pela vacina BCG. Constata-se também que o número reduzido de casos positivos na faixa dos 0 aos 14 anos (2 casos) se possa justificar em consequência da vacinação pela vacina BCG que à nascença é administrada a todos os recém-nascidos. A vacinação é um método imunoprolático, daí que este resultado possa estar relacionado com a imunidade adquirida através da vacinação pela BCG.

A ARS também incluiu no estudo os fatores de risco mais associados à infeção da tuberculose e multirresistências. Tal como referido em vários estudos, a tuberculose multirresistente está relacionada com alguns fatores de risco como alcoolismo, DPOC, toxicod dependência com consumo de drogas por via endovenosa ou outra via, coinfeção com HIV e hepatites, abandono dos tratamentos, entre outros. Este estudo reportou cerca de 24% de casos em que pelo menos um dos fatores anteriormente descritos estava relacionado com a infeção por tuberculose. O número de casos de tuberculose com

historial de consumo de álcool reduziu cerca de 10% entre 2009 e 2010. Em relação ao consumo de drogas também reduziu na ordem dos 22%. A tuberculose em reclusos e sem-abrigo também tem vindo a decrescer nos últimos anos, segundo a ARS. No entanto, mais de 60% dos casos de tuberculose estudados pela ARS ocorreram em doentes sem fatores de risco associados, havendo uma tendência para diminuir esta percentagem a um ritmo ligeiro.

Em relação ao perfil de suscetibilidades e à sua relação com utilizadores de drogas de abuso, um estudo efetuado nos Estados Unidos, por Perri e colaboradores em 2011, revela que 31% dos doentes apresentaram resistência à isoniazida. A maioria destes pacientes é natural de Nova Iorque e com historial de utilização de drogas ilegais. Destes utilizadores de drogas, 86% utilizavam drogas não injetáveis. Foi igualmente apresentado um caso de uma criança que apresentou resistência à isoniazida, que foi relacionado com a utilização de drogas de abuso pela mãe. As drogas de abuso mencionadas foram cocaína, heroína e marijuana (Perri, B. et al, 2011).

A associação de tuberculose e HIV também é objeto de um estudo em Trinidad e Tobago, que em 2006 revela que 30,6% da população com tuberculose apresenta coinfeção com HIV, o que se traduz num problema grave de saúde pública (Baboolal, S. et al, 2009). Em 2009, foram reportados pela ARS 108 casos de tuberculose em doentes com infeção pelo HIV, numa prevalência de coinfeção de 11,9% dos casos com resultado de serologia conhecido. Foi observada ao longo dos anos pela ARS uma redução da coinfeção na ordem dos 44%. No nosso estudo, ainda podemos acrescentar que em 58% dos casos de pesquisa de tuberculose com resultado positivo não foi solicitada a serologia do HIV, e em 40% dos casos o resultado desta foi negativo. Nos casos de serologia com resultado conhecido, apenas se detetaram 2 casos de coinfeção, relativos a uma mulher e um homem na faixa etária dos 30-37 anos. De salientar que nestes casos o perfil de suscetibilidade revela ser sensível a todos os fármacos de 1ª linha.

Lorent e colaboradores, referem em 2011 num estudo no Rwanda que a tuberculose e a coinfeção tuberculose-HIV é o maior problema de saúde pública em países com recursos limitados. O tratamento está sujeito a constantes alterações nos pacientes com infeção por tuberculose e HIV devido a interações medicamentosas dos antibióticos e dos retrovíricos, reações imunopatológicas e outras infeções recorrentes. (Lorent, N., et al, 2011). Segundo a OMS, em África, o HIV é o fator que mais contribui para o aumento da incidência de tuberculose.

Quanto à localização da infecção, os casos de tuberculose registados no estudo da ARS em 2010 (1017) foram caracterizados com 67,6% de localização exclusiva pulmonar, 5,8% de localização pulmonar com outra localização, e 26,6% de localização extrapulmonar exclusiva. Se compararmos, no nosso estudo a grande maioria dos casos identificados de tuberculose são de origem pulmonar, havendo apenas um caso de infecção no sistema digestivo, e identificação de MTC em cinco amostras de pus. Todos os restantes produtos onde foi identificado o MTC são de origem pulmonar com 96% dos casos. Salientamos que as amostras biológicas nas quais é mais solicitada a pesquisa do MTC são amostras provenientes do sistema respiratório, como esputo, lavados brônquicos e lavados broncoalveolares, o que indicia a elevada percentagem de tuberculose de localização pulmonar.

A multirresistência aos antibióticos antituberculosos, além de associada a uma taxa de mortalidade mais elevada, apresenta um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes, com um aumento dos efeitos secundários da medicação, estando ainda associada a custos mais elevados, sendo necessárias novas abordagens para o tratamento e prevenção destas multirresistências, principalmente nos países mais pobres. As drogas antituberculosas revelam efeitos adversos como problemas hepatotóxicos, neuropatias periféricas, intolerâncias gastrointestinais e rash cutâneo (Lorent, N., et al, 2011).

Dados recentes da OMS revelam que foram atingidas as maiores taxas de multirresistência de sempre, estimando que cerca de 490000 casos de MDR-TB e 40000 novos casos de XDR-TB emergem todos os anos, originando cerca de 110000 mortes (WHO, 2008). Os resultados do tratamento da MDR-TB e XDR-TB têm-se revelado muito desanimadores, quer nos países em desenvolvimento quer nos países mais desenvolvidos, incluindo nos doentes seronegativos na Europa, Estados Unidos e Coreia, estando a XDR-TB associada a uma maior taxa de insucesso terapêutico e mortalidade do que a MDR-TB. (Kim, R. 2007; Matteelli, A. et al, 2007; Migliori, B. 2007).

A resistência aos antituberculosos de 1ª linha, principalmente nas MDR-TB, é uma das principais ameaças ao controlo da tuberculose, atingindo, segundo dados da OMS, maior magnitude nos países de Leste da Europa e da Ásia. De acordo com a mesma fonte, estima-se que a prevalência mundial de multirresistência em 2006 tenha atingido 4,8% do total de casos de tuberculose registados. Segundo a ARS, a incidência de multirresistência em Portugal em 2008 foi de 2% dos casos de tuberculose, valor comparável à mediana dos valores apresentados na União Europeia.

O estudo realizado pela ARS reporta os TSA de janeiro de 2008 a dezembro de 2010, (3217 TSA pertencentes a 2468 doentes). Estes fornecem informação relativa aos antibióticos INH, EMB, STR e RIF, mas relativamente à PZA apenas são reportados em 42,4% dos pacientes (1046 pacientes). O CHVNG (onde são realizados os TSA do nosso estudo) foi o laboratório que mais dados forneceu ao estudo, na região Norte, seguido do Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias do INSA e do Centro de Diagnóstico Pneumológico (CDP).

Analisando os resultados do perfil de suscetibilidade dos pacientes estudados pela ARS 14,1% apresentavam resistência a pelo menos um dos 4 antibióticos de 1ª linha acima referidos. No nosso estudo verificamos que um total de 15,4% dos pacientes estudados apresentava resistência a pelo menos um dos antibióticos de 1ª linha. A resistência à isoniazida nos pacientes estudados pela ARS foi de 6,6%. O estudo refere que mais de metade dos pacientes com resistência à isoniazida (53,6%) pertencem aos concelhos de Porto, Matosinhos, Santa Maria da Feira (onde se insere o CHEDV), Braga, Gondomar, Guimarães, Famalicão, Viana do Castelo e Vila do Conde. Em Santa Maria da Feira, foi reportado no estudo da ARS 11,3% de resistência isolada à isoniazida. No nosso estudo, obtivemos 9,2% de casos de resistência à isoniazida. O número superior de pacientes estudados pela ARS justificará a diferença de percentagens de resistência à isoniazida relativamente ao presente estudo.

De salientar que os casos de resistência à isoniazida detetados no nosso estudo (12) correspondem a nove elementos do sexo masculino e três do sexo feminino. No estudo da ARS, 66% dos pacientes com resistência à isoniazida eram do sexo masculino e 34% eram do sexo feminino.

As faixas etárias que mais pacientes com resistência à isoniazida reportam são os grupos de idades superiores a 44 anos. Na nossa amostra, a maioria dos pacientes que apresentam resistência à isoniazida enquadram-se nestas faixas etárias.

A resistência total à rifampicina reportada pela ARS foi de 1,4%, sendo que a resistência isolada se situou nos 0,2%. A resistência total ao etambutol registada foi de 1,2%. Não foram encontrados no nosso estudo perfis de resistência isolada à rifampicina e ao etambutol, no entanto obteve-se 2,3% de resistência total à rifampicina e 1,5% de resistência total ao etambutol.

Relativamente à estreptomicina, a ARS reportou uma prevalência de resistência de 12,8%. A maioria dos pacientes com resistência à estreptomicina pertenciam a 9

concelhos da região nos quais estava incluído o concelho de Santa Maria da Feira. No nosso estudo, reporta-se 13,1% de estirpes com resistência total à estreptomicina.

A pirazinamida, estudada em menos pacientes pela ARS (1046), apresentou uma prevalência total de resistência de 1,8%, e apresentou 0,38% de resistência isolada ao fármaco. Na nossa população foram encontrados 2,3% de resistência total à pirazinamida, assim como, 0,8% de resistência isolada ao fármaco.

A resistência simultânea aos fármacos de 1ª linha é portanto mais comum. A ARS reportou 1,2% de casos de resistência à rifampicina e isoniazida, o que indica a presença de MDR-TB. Segundo este estudo, a maioria destes pacientes pertence ao sexo masculino e enquadra-se na faixa etária dos 45-64 anos. No nosso estudo não obtivemos nenhum caso de resistência apenas à isoniazida e à rifampicina. No entanto obteve-se um caso de resistência à isoniazida, rifampicina e estreptomicina e dois casos apresentaram resistência a todos os fármacos de 1ª linha.

Na Índia, em 2009, foram reportados 1,2 milhões de novos casos de tuberculose. Destes casos, 1,8% falharam o plano de tratamento com os fármacos de 1ª linha. Foram igualmente notificados 228756 reinfeções por tuberculose em que 4% falharam a antibioterapia de 1ª linha (Nagaraja, S., et al, 2011).

Estudos efetuados no Vietname revelam 6,7% de MDR-TB comparando com os 2% encontrados em estudos na Holanda. No Vietname foram reportados 32,1% de resistência à isoniazida para 11% na Holanda, e 44% para 15,9% de resistência à estreptomicina. Segundo estes estudos, a vacinação deverá ser dirigida para as áreas mais endémicas e os tratamentos devem ser administrados conforme o perfil genético do MTC presente, o que poderá influenciar a escolha dos antituberculosos. Os estudos de prevalência em locais de elevada incidência de novos casos tornam-se portanto importantes, especialmente nos estudos de predominância fenotípica das estirpes de MTC (Kremer, K., et al, 2009).

No Uganda, em 2008, estudos revelam que 12,7% da população estudada apresenta MDR-TB. A resistência aos antibióticos de 2ª linha é baixa. Segundo estes estudos, os fatores associados às multirresistências da tuberculose incluem um historial de tratamento falhado, múltiplos episódios de tuberculose e lesões cavitárias identificadas nas radiografias pulmonares (Temple, B. et al, 2008).

Na Venezuela, foram reportados 0,5% de casos de MDR-TB em doentes tratados pela primeira vez e 13,5% de multirresistências em recidivas da infeção (Aristimuño, L, et al,

2006). Foram igualmente reportados neste estudo 64% de resistência à rifampicina e 43% de resistência à isoniazida. Na Turquia, foi revelado num estudo de Agarwal e colaboradores que cerca de 29% dos pacientes estudados apresentava resistência a pelo menos um dos fármacos de 1ª linha, 4,5% apresentava perfil de MDR-TB, 15,5% de resistência à isoniazida, 13,4% à estreptomicina, 6,3% de resistência à rifampicina, e 6,0% ao etambutol. Cerca de 28% da população estudada não apresentava perfil de multirresistências. De salientar que o maior número de multirresistências encontradas neste estudo representavam elementos do sexo masculino (Agarwal, M. et al, 2010).

Tal como demonstrado num estudo efetuado numa província da China, os encargos com a luta contra a tuberculose são elevados. Na China os níveis de multirresistência aos antituberculosos (MDR-TB) em 2008 eram de cerca de 37,8% segundo a OMS. Segundo alguns estudos, estas resistências não são devidas à transmissão recente de tuberculose, mas sim a uma reativação da infeção ou causa de uma terapêutica inadequada (Wang, J., et al 2011).

A XDR-TB constitui uma ameaça global de elevada importância para a saúde pública mundial. A existência da XDR-TB é o reflexo do fracasso no controlo da tuberculose e da implementação das medidas recomendadas no WHO's Stop TB Strategy, que deveria minimizar a emergência de resistência aos fármacos (Raviglione, M., et al 2006).

Além de aumentar os níveis de mortalidade, a multirresistência tem um impacto significativo na qualidade de vida dos doentes, uma vez que os efeitos secundários da medicação são cada vez mais graves e frequentes, estando ainda associados a custos mais elevados, pelo que são necessárias novas abordagens para prevenir a disseminação da XDR-TB e para o tratamento da doença principalmente nos países mais pobres. No entanto, são poucas as alternativas terapêuticas disponíveis para a XDR-TB. Os fármacos mais recentemente estudados como o linezolid apresentam novos mecanismos de ação mas podem necessitar de combinações de fármacos tão extensas e períodos de tratamento mais longos que os fármacos mais antigos. Se por um lado a combinação de fármacos é indispensável para evitar o desenvolvimento de resistências, por outro está associada a um aumento dos efeitos secundários, a custos de tratamento mais elevados e a uma diminuição da adesão ao tratamento.

Nos pacientes estudados no CHEDV, dois apresentavam multirresistência a todos os fármacos de 1ª linha. No entanto, um deles apresentou sensibilidade a todos os fármacos de 2ª linha. O outro paciente apresentou resistência a todos os fármacos de 1ª linha, alguns de 2ª linha e aos três fármacos injetáveis, canamicina, capreomicina e amicacina.

No entanto, não apresentou resistência às fluoroquinolonas, não originando por isso um caso de XDR-TB. Este paciente foi tratado com os fármacos de 2ª linha aos quais a estirpe era suscetível e com linezolid.

Atualmente, segundo a OMS, a maioria dos programas de controlo da tuberculose não necessita da introdução de fármacos de 2ª linha para o controlo da doença. Os esquemas curtos de antibioterapia, associados às linhas de orientação DOTs, podem curar mais de 90% dos doentes com tuberculose, assim como prevenir a transmissão da doença (Méndez, A. et al, 2002). Os custos associados a um tratamento de MDR-TB podem permitir o tratamento a 100 infetados com tuberculose não resistente. Muitas vidas podem ser salvas se se conseguir minimizar o número de casos de MDR-TB.

A introdução de regimes de esquemas curtos de drogas antituberculosas, associados à implementação correta das estratégias DOTs pode diminuir a incidência e mortalidade da tuberculose em cerca de 40% até ao ano de 2030. Estes regimes são particularmente importantes onde a prevalência de multirresistência aos antituberculosos é acentuada. No entanto, a resistência a estas novas drogas pode surgir, nomeadamente em zonas de incidência elevada de infeção de HIV (Salomon, J. et al, 2006).

Em Portugal, a tuberculose tem evoluído favoravelmente nos últimos anos na região de saúde do Norte. No entanto, é importante consolidar os esforços de controlo da transmissão e infeção por tuberculose, principalmente nas áreas de maior risco. A evolução da situação de tuberculose no sexo feminino, nomeadamente o decréscimo nas notificações e aumento na mortalidade por tuberculose obrigam a mais estudos e desenvolvimento de estratégias de intervenção direcionadas para aquele grupo populacional.

A tuberculose nos grupos de risco tem tido uma evolução favorável nos últimos anos, nomeadamente nos infetados pelo HIV, nos toxicodependentes e nos alcoólicos. No entanto, os resultados do tratamento mostram-se menos favoráveis do que nos pacientes sem risco identificado, pelo que deverá dar-se mais atenção à necessidade de diagnosticar a doença mais precocemente e de supervisionar mais intensivamente o tratamento, procurando diminuir a morbilidade e o abandono dos tratamentos (ARS-Norte, 2011).

A melhoria do sucesso terapêutico nos casos de tuberculose pulmonar bacilífera, ultrapassando os 90% de sucesso nos últimos dois anos, indica que o investimento que os profissionais de saúde têm feito no controlo da tuberculose tem dado resultados.

10. PERSPETIVAS FUTURAS

Sendo ainda insuficiente o conhecimento da patogénese da doença, torna-se um problema a descoberta de novas vacinas. A baixa incidência da doença em países economicamente desenvolvidos não será também um fator favorável ao desenvolvimento da investigação.

Uma vacina, idealmente, deveria ser significativamente eficaz para evitar a invasão nos tecidos pelo bacilo; proteger contra a tuberculose primária e secundária; e contribuir para a destruição dos bacilos persistentes e evitar a reinfeção endógena.

As aprendizagens do passado dizem-nos que a solução do problema mundial da tuberculose não passa apenas por novas armas terapêuticas mais potentes e eficazes. A vitória contra esta temível doença requer, sobretudo, uma política estratégica adequada a cada país e uma organização que a suporte, assim como o eficaz combate à pobreza, à iliteracia e ao subdesenvolvimento (Pina, J. 2000).

A tuberculose é nos dias de hoje uma doença com bom prognóstico. As taxas de cura superiores a 95% e de mortalidade inferior a 1/100.000, que se observam nos países com bom nível higieno-sanitário, significam que a tuberculose, mesmo em contextos epidemiológicos desfavoráveis como a infeção por HIV, é uma doença com um bom prognóstico desde que se respeitem as regras terapêuticas bem definidas. Os atrasos na instituição da terapêutica, a não-adesão aos tratamentos e a multirresistência são os fatores mais deletérios para o prognóstico (Pina, J. 2000).

Segundo Pina em 2000, no futuro “teria de se incrementar a generalização da Toma Observada Directamente (TOD) durante o tratamento”. Este revelou-se um dos pilares da adesão e do cumprimento da terapêutica, diminuindo a possibilidade de aparecimento de estirpes multirresistentes e reduzindo o custo de cada caso tratado – boa relação custo/eficácia. Continuará a ser necessária a hospitalização dos casos de pacientes multirresistentes e períodos curtos de internamento hospitalar para grupos especiais de doentes (seropositivos para HIV, recidivas, toxicodependentes, alcoólicos, diabéticos).

As campanhas DOTs podem-se tornar eficazes no controlo da prevalência da tuberculose nas populações endémicas de infeção por HIV. Isto poderá traduzir-se no controlo efetivo da transmissão da tuberculose no período sub-clínico de infeciosidade do paciente (Corbett, E. et al, 2007).

A investigação e informação epidemiológica são a base do planeamento das atividades e políticas futuras do controlo da tuberculose. E para isso, deverá haver um reforço do seu

estudo para um conhecimento eficaz da disseminação da doença, com recurso sistemático à utilização de marcadores genéticos do MTC, nomeadamente, o “DNA fingerprinting” – RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) que parece não ser afetado pelo aparecimento de resistências.

É cada vez mais generalizada a preocupação resultante do uso inadequado e indiscriminado de antibióticos e consequente desenvolvimento de resistências por parte das bactérias. As bactérias, como todos os microrganismos, tendem a adaptar-se às condições do meio que as rodeia, e é precisamente dessa adaptação que surgem as resistências aos antibióticos.

Estudos de investigação têm-se orientado na aplicação de bacteriófagos, também conhecidos como fagos, no tratamento de algumas doenças infecciosas. Estes são uma classe de vírus, que sendo incapazes de infetar organismos mais complexos, vivem das bactérias. Quando um destes vírus infeta uma bactéria, reproduz-se no seu interior, resultando no rebentamento da bactéria que liberta novos fagos prontos para atacarem outras bactérias. Cada fago é específico para cada bactéria. É precisamente nesse processo que se enquadra a terapia fágica, que permite ao identificar a bactéria responsável pela infeção, combatê-la utilizando para isso o fago que lhe é específico (Nunes, J. 2011).



Figura 29 - Fagos

As vantagens da terapia fágica são as seguintes:

- Os fagos são específicos para determinada bactéria, o que significa que não prejudicam as bactérias benéficas que vivem no nosso organismo (e.g. flora intestinal), ao contrário dos antibióticos convencionais;
- É mais difícil as bactérias desenvolverem resistência aos bacteriófagos, pois estes adaptam-se juntamente com estas;

- Teoricamente, os fagos reproduzem-se até destruírem todas as bactérias, até ao ponto em que eles próprios são eliminados;
- O custo do desenvolvimento de um tratamento fago é mais barato do que o de novos antibióticos;
- Pode ser utilizada no tratamento clínico e prevenção de doenças infecciosas;
- Os efeitos secundários são extremamente raros (Nunes, J. 2011).

As desvantagens da terapia fágica são as seguintes:

- A lise celular das bactérias pode resultar na libertação de grandes quantidades de endotoxinas bacterianas ligadas à membrana;
- Alguns fagos podem codificar toxinas;
- A neutralização dos fagos pelo sistema imune do hospedeiro pode levar ao fracasso da terapia fágica (Nunes, J. 2011).

Esta terapia não se propõe substituir totalmente a utilização de antibióticos químicos, mas sim a construir em alguns casos uma alternativa ao seu uso e noutros até um complemento.

A aplicação da terapia fágica à tuberculose ainda se revela precoce, uma vez que apenas foi descoberto o fago D29, num estudo de otimização de um ensaio de amplificação de um bacteriófago para o reconhecimento mais preciso do *Mycobacterium avium*, sub-espécie paratuberculosas (Foddai et al, 2009). A implementação e estudos de investigação acerca das terapias fágicas ainda está restrita a alguns países (Polónia, Geórgia, entre outros), uma vez que ainda não existem testes que confirmem segurança à sua aplicação. Nesse sentido, Portugal já se encontra a dar os primeiros passos em estudos para aplicação de terapia eficaz para o tratamento e prevenção de infeções humanas.

Torna-se cada vez mais evidente que os fagos assumem um papel de relevo no tratamento clínico e prevenção de doenças infecciosas (Parisien et al, 2008). No caso dos fagos destinados ao uso humano, são requeridos requisitos mais apertados de qualidade, sendo que o seu uso se encontra inteiramente dependente das autoridades de saúde que terão sempre que autorizar a sua utilização no tratamento e prevenção de infeções (Skurnik e Strauch, 2006; Skurnik et al, 2007).

Os ensaios realizados em animais, usando as bactérias mais patogênicas para o ser humano, mostram resultados satisfatórios da aplicação da terapia fágica, mas para que seja aprovada a aplicação no ser humano torna-se necessário haver uma regulamentação. Ainda não existem fagos estudados e aplicados na clínica no tratamento da tuberculose por MTC.

Dadas as potencialidades dos fagos em relação aos antibióticos, a terapia fágica apresenta um futuro que se avizinha promissor na sua aplicação na prática clínica, necessitando de mais estudos controlados.

A melhor medicina preventiva da tuberculose é a melhor medicina curativa!

11. BIBLIOGRAFIA

- Administração de Saúde Regional do Norte I.P. 2011. A Tuberculose na Região de Saúde do Norte 2000-2010. Ministério da Saúde. Portugal.
- Agarwal M, Gunal S, Durmaz R, Yang Z. 2010. Integration of *Mycobacterium tuberculosis* Drug Susceptibility Testing and Genotyping with Epidemiological Data Analysis To Gain Insight into the Epidemiology of Drug-Resistant Tuberculosis in Malatya, Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 48(9): 3301-05.
- Álvares E. 2009. Diagnóstico de Micobacterioses. Jornadas Biomérieux. Biomérieux. Porto (Formato powerpoint).
- Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World – Fourth Global Report; The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002-2007.
- Arbex M, Varella M, Siqueira H, Mello F. 2010. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 2: Fármacos de 2ª linha. Artigo de Revisão. Hospital Nestor Goulart Reis. São Paulo. Brasil.
- Aristimuño L, Armengol R, Cebollada A, España M, Guilarte A, Lafoz C, Lezcano M, Revillo M, Matin C, Ramírez C, Rastogi N, Rojas J, Salas A, Sola C, Samper S. 2006. Molecular characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the First National Survey of Anti-tuberculosis Drug Resistance from Venezuela. *BMC Microbiology*.
- Baboolal S, Millet J, Akpaka P, Ramoutar D, Rastogi N. 2009. First Insight into *Mycobacterium tuberculosis* Epidemiology and Genetic Diversity in Trinidad and Tobago. *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 47 (6) 1911-14.
- Becton Dickinson and Company. 2009. BACTEC MGIT 960 kits – For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. EUA.
- Becton Dickinson and Company. 2009. BACTEC MGIT 960 PZA kit - For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. EUA.

- Becton Dickinson and Company. 2009. BBL Mycoprep – Kit de digestão / descontaminação de amostras para o processamento de amostras de micobactérias. EUA.
- Becton Dickinson and Company. 2010. BACTEC PANTA/F suplemento antimicrobiano. EUA.
- Becton Dickinson and Company. 2010. BACTEC Supplement/F Media Supplement. EUA.
- Becton Dickinson and Company. 2010. Frascos de Cultura BACTEC Myco/F-Sputa. EUA.
- Becton Dickinson and Company. 2010. Frascos de Cultura BACTEC Myco/F-Lytic. EUA.
- Becton Dickinson and Company. 2010. ProbeTec ET *Mycobacterium tuberculosis Complex* (DTB) Direct Detection Reagent Pack. EUA.
- Capone D, Jansen J, Lopes A, Anna C, Soares M, Pinto R, Siqueira H, Marchiori E, Capone R. 2006. Diagnóstico por imagem da tuberculose pulmonar. Rio de Janeiro. Brasil. 166-173.
- Carvalho J. A profilaxia da tuberculose: o BCG e a quimioprofilaxia.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing. Nineteenth Informational Supplement. USA. M100S19. Vol: 29(3)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2010. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement.
- Corbett E, Bandason T, Cheung Y, Munyati S, Godfrey-Faussett P, Hayes R, Churchyard G, Butterworth A, Mason P. 2007. Epidemiology of Tuberculosis in a High HIV Prevalence Population Provide with Enhanced Diagnosis of Symptomatic Disease. PLoS Medicine. Vol 4.
- Cui Z, Wang J, Huang X, Hu Z. 2011. Association of mutation patterns in *gyrA/B* genes and ofloxacin resistance levels in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East China in 2009. BioMed Central Infections Diseases.
- Direção Geral de Saúde. 2006. Sistema de Vigilância da Tuberculose (SVIG-TB). Portugal.

- Direção Geral de Saúde. 2008. Doenças de Declaração Obrigatória 2003-2007. Direção de Serviços de Epidemiologia e Estatísticas da Saúde. Divisão de Epidemiologia. Lisboa. Portugal.
- Direção Regional de Saúde. Programa Regional de Prevenção e Controlo da Doenças Respiratórias. 2009-2012. Direção Geral de Saúde. Portugal.
- Dye C. et al. 2007. Did we reach the 2005 targets for tuberculosis control?. *Bull World Health Organ.* 85: 364-69.
- Erturan Z, Uzun M. 2005. In vitro activity of linezolid against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 26: 78-80.
- Ferreira W, Sousa J. 1998. Microbiologia. Edições Técnicas LIDEL. Portugal. Vol 1.
- Ferreira W, Sousa J. 2000. Microbiologia. Edições Técnicas LIDEL. Portugal. Vol 2.
- Ferreira W, Sousa J, Lima N. 2010. Microbiologia. Edições LIDEL. Portugal.
- Foddai A, Elliott C, Grant I. 2009. Optimization of a phage amplification assay to permit accurate enumeration of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis cells. *Appl Environ Microbiol* 75(12):3896-902.
- Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. 1998. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10ª edição. Mosby. Inc.715-743
- Fortún J, Martin-Davila P, Navas E. et al. 2005. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *J Antimicrob Chemother.* 56: 180-5.
- Foy C, Parkes H. 2001. Emerging Homogeneous DNA-based Technologies in the Clinical Laboratory. *Bio-Analytical Innovations Team.* Reino Unido.
- Global Tuberculosis Control: WHO Report 2008.
- Guidelines for Surveillance of Drug Resistance in Tuberculosis. 2009. Fourth Edition. World Health Organization.
- Guendouzi S, Suzanna D, Hassi M, Haggoud A, Souda S, Houari A, Iraqui M. 2011. Isolation and Identification of *Bacillus* strains with antimycobacterial activity. *African Journal of Microbiology Research.* 2786-2792.

- Hain-Lifescience. 2009. GenoType MTBDR_{plus}- Teste de Genética Molecular para a Identificação da Resistência à Rifampicina e/ou Isoniazida do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Alemanha.
- Hain-Lifescience. 2009. GenoType MTBDR_s- Molecular Genetic Assay for Identification of Resistances to Fluoroquinolones, Aminoglycosides/Cyclic Peptides and Ethambutol of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Alemanha.
- Holtz T. 2007. XDR-TB in South Africa : revised definition. *PLoS Med* 2007. 4: 161.
- Huang H, Tsai Y, Lee J, Chiang M, Chen Y, Chiang C, Lin N, Tsai P. 2010. Mixed Infection with Beijing and Non- Beijing Strains and Drug Resistance Pattern of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 48: 4474-80,
- Isenberg H. 2005. *Clinical Microbiology Procedures Hand Book*. ASM Press. Washington DC. Vol 1 (3).
- Jawetz, Melnick e Adelberg. 2005. *Microbiologia Médica*. 22ª edição. McGraw-Hill. Rio de Janeiro. 259-268.
- Kim H, et al. 2007. Impact of extensively drug resistance of treatment outcomes in non-HIV-infected patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis*; 45:1290-5.
- Kremer K, Werf M, Au B, Anh D, Kam K, Doorn H, Borgdorff M, Soolingen D. 2009. Vaccine-induced Immunity Circumvented by Typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains. *Emerging Infectious Diseases*. Vol 15(2).
- Lago J. 2009. Diagnóstico de Micobacterioses. *Jornadas Biomérieux*. Biomérieux. Porto. (Formato powerpoint).
- Louie M, Louie L, Simor A. 2000. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *Canadian Medical Association or its licensors*. 301-309.
- Lorent N, Sebatunzi O, Mukeshimana G, Ende J, Clerinx J. 2011. Incidence and Risk Factors of Serious Adverse Events during Antituberculous Treatment in Rwanda: A Prospective Cohort Study. *PLoS ONE*. Vol 6 (5): 1-7.

- Mandell G, Bennett J, Dolin R. 2003. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6ª edição. Elsevier Inc. Churchill Livingstone. Vol 2: 2852-2885.
- Manual de meios de cultura e suplementos. 2003. Biomérieux.
- Manual de Procedimentos para Pesquisa de Micobactérias instituído no Serviço de Microbiologia sector dos Bk, da Patologia Clínica do CHEDV.
- Marmion B, Fraser A, Duguid J, Collee J. 1993. Microbiologia Médica. 6ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Matteelli A. et al. 2007. Multidrug - resistant and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis: epidemiology and control. *Expert Ver Anti Infect Ther.* 5:857-71.
- Maza L, Pezzlo M, Baron E. 1999. Atlas de Diagnóstico em Microbiologia. Artmed. S. Paulo. Brasil.
- Méndez A, Gowda D, Frieden T. 2002. Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework. WHO.
- Migliori G, Besozzi G, Girardi E, et al. 2007. Clinical and operational value of the extensively drug-resistant tuberculosis definition. *Eur Respir J*; 30: 623-6.
- Miller O, Gonçalves R. 1999. Laboratório para o Clínico. 8ª edição. Atheneu. Rio de Janeiro. 375-379.
- Mitnick C, McGee B, Peloquin C. 2009. Tuberculosis pharmacotherapy: strategies to optimize patient care. *Expert Opin Pharmacother.*
- Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. 2000. Microbiologia Médica. 3ª edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Brasil.
- Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover F, Tenover K. 2003. Manual of Clinical Microbiology. 8ª edição. ASM Press. Washington DC. Vol 1: 532-560.
- Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. 2006. Microbiologia Médica. 5ª edição. Mosby, Elsevier. Brasil. 239-301.
- Nagaraja S, Satyanarayana S, Chadha S, Kalemene S, Jaju J, Achanta S, Reddy K, Potharaju V, Shamrao S, Dewan P, Rony Z, Tetali S, Anchala R, Kannuri N, Harries A, Singh S. 2011. How Do Patients Who Fail First- Line TB treatment but Who Are Not Placed on an MDR-TB Regimen Fare in South India?. *PLoS ONE*. Vol 6.

- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2003. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. USA. M24-A, Vol 23 (18).
- Nunes J, 2011. Novas alternativas aos antibióticos: bacteriófagos, hidrolases da parede celular e peptídeos antimicrobianos. Universidade Federal de Lavras. Brasil.
- Park I, Hong S, Oh Y, et al. 2006. Efficacy and tolerability of daily-half dose linezolid in patients with intractable multidrug-resistant tuberculosis. *J. Antimicrob Chemother.* 58:701-4.
- Parisien A, Allain B, Zhang J, et al. 2008. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology* 104:1-13.
- Perri B, Proops D, Moonan P, Munsiff S, Kreiswirth B, Kuperina N, Goranson C, Ahuja S. 2011. *Mycobacterium tuberculosis* Cluster with Developing Drug Resistance, New York, New York, USA, 2003-2009. *Emerging Infectious Diseases*. Vol 17 (3): 372-378.
- Pina J. 2000. A tuberculose – Na Viragem do Milénio. Portugal. Edições Técnicas LIDEL.
- Portal da Direcção Geral de Saúde, disponível em www.dgs.pt, consultado em 25/01/2012
- Portal da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, disponível em www.ff.up.pt/toxicologia, consultado em 24/01/2012.
- Prevots D, Shaw P, Strickland D, Jackson L, Raebel M, Blosky M, Oca R, Shea Y, Seitz A, Holland S, Olivier K. 2010. Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease Prevalence at Four Integrated Health Care Delivery Systems. *Am J Respir Crit Care Med*. Vol 182.
- Princípios Gerais de Antibioterapia. 2011. Orientação da Direcção Geral de Saúde. Portugal.
- Programa Nacional de Controlo de Infecção (PNCI). 2004. Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia.

- Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose (PNT). 2010. Tuberculose Latente: Projecto de expansão dos testes IGRA. Circular Informativa. Direcção Geral de Saúde.
- Programa Nacional de Vacinação 2012. Norma da Direcção Geral de Saúde. Portugal.
- Programa Regional de Prevenção e Controlo da Doenças Respiratórias 2009-2012 da Direcção Regional da Saúde. Portugal.
- Raviglione M, Uplekar M. 2006. WHO's new Stop Tb Strategy". *Lancet*. 367: 952-55.
- Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Maher M, Soolingen D, Barry T. 2011. Novel Multiplex Real-Time PCR Diagnostics Assay for Identification and Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. Vol 49 (2).
- Rich M, Socci A, Mitnick C, et al. 2006. Representative drug susceptibility patterns for guiding design of retreatment regimens for MDR-TB. *Int J Tuberc Lung Dis*; 10:290-96.
- Richter E, Rüscho-Gerdes S, Hillemann D. 2007. First linezolid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 51: 1534-36.
- Rodriguez J, Cebrián L, et al. 2004. Mutant prevention concentration: comparison of fluoroquinolones and linezolid with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 441-444.
- Rosseti M, Valim A, Silva M, Rodrigues V. 2002. Tuberculose resistente: revisão molecular. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Brasil. 525-530.
- Salomon J, Lloyd-Smith J, Getz W, Resch S, Sánchez M, Porco T, Borgdorff M. 2006. Prospects for Advancing Tuberculosis Control Efforts through Novel Therapies. *PLoS Medicine*. Vol 3 (8): 1303-8.
- Sérgio J, Coutinho I, Marques S. 2004. Fundamentos de Patologia para Técnicos de Saúde. 2ª edição. Lusociência. Portugal.

- Shales D, Gerding D, John J, Craig W, Bornstein D, Duncan R, Eckman M, Farrer W, Greene W, Lorian V, Levy S, McGowan J, Paul S, Ruskin J, Tenover F, Watanakunakorn C. 1997. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the Prevention of Antimicrobial Resistance in Hospitals. University of Chicago. 584-589.
- Skurnik M, Pajumen M, Kiljumen S. 2007. Biotechnological challenges os phage therapy. *Biotechnol Lett* 29:995-1003.
- Skurnik M, Strauch E. 2006. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Microbiol* 296:5-14. Smith
- Sousa JC. 2006. Manual de Antibióticos Antibacterianos. 2ª edição. Portugal. Edições Universidade Fernando Pessoa.
- Teixeira H, Abramo C, Munk M. 2007. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. Artigo de revisão. *J Bras Pneumology*. 33(3): 323-334.
- Temple B, Ayakaka I, Ogwang S, Nabanjja H, Kayes S, Nakubulwa S, Worodria W, Levin J, Joloba M, Okwera A, Eisenach K, McNerney R, Elliott A, Smith P, Mugerwa R, Ellner J, Jones-Lopez E. 2008. Rate and Amplification of Drug Resistance among Previously- Treated Patients with Tuberculosis in Kampala, Uganda. *Clin Infect Dis*.
- Tuberculosis MDR-TB & XDR-TB The 2008 Report. WHO The Stop TB Department.
- Von der Lippe B, Sandven P, Brubakk O. 2006. Efficacy and safety of linezolid in multidrug- resistant tuberculosis (MDR-TB) – a report of ten cases. *J infect*, 52: 92-6.
- Vranjac A. 2005. Micobacterioses: Recomendações para o diagnóstico e tratamento. Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo. Brasil.
- Wang J, Lui Y, Zhang C, Ji B, Zhang L, Shao Y, Jiang S, Suzuki Y, Nakajima C, Fan C, Ma Y, Tian G, Hattori T, Ling H. 2011. Genotypes and Characteristics of Clustering and Drug Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Collected in Heilongjiang Province, China. *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 1354-62.

- WHO. 2006. Guidelines for the programmatic management of drug resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization.

12. ANEXOS

12.1. Anexo 1

Direcção-Geral da Saúde

Circular Informativa

Tabela 1 – Algoritmo para o diagnóstico de infecção latente, e consequente ponderação de tratamento, após contacto próximo com TB infecciosa, conforme a vulnerabilidade da população alvo e os resultados dos testes.

População Alvo	Tuberculina (TST)	IGRA	Tratamento	Seguimento
Crianças <5 anos (1)	Positivo (≥ 10 mm)	(2)	Elegível	(4)
		Positivo	Elegível	(4)
	Positivo (5-9mm)	Indeterminado	Não elegível(3)	TST 8-12 sem (6)
		Negativo	Não elegível(3)	TST 8-12 sem (6)
	Negativo (<5mm)	Positivo	Elegível	(4)
		Indeterminado	Não elegível	TST 8-12 sem(6)
Pessoas de qualquer idade imunodeprimidos (1)	Positivo (≥ 5 mm)	Positivo	Elegível	(4)
		Indeterminado	Não elegível	TST 8-12 sem
	Negativo (<5mm)	Negativo	Não elegível	TST 8-12 sem
		Negativo	Não elegível	TST 8-12 sem(6)
Crianças ≥ 5 anos ou adultos não imunodeprimidos	Positivo (≥ 15 mm)	Positivo	Elegível	(4)
		Indeterminado	Cfm o risco(5)	Trata ou repete IGRA
	Positivo (10-14mm)	Negativo	Cfm o risco(5)	Trata ou repete IGRA
		Positivo	Elegível	(4)
	Negativo (<10mm)	Indeterminado	Cfm o risco(5)	Trata ou repete IGRA
		Negativo	Não elegível	IGRA 8-12 sem

- (1) A indicação de não elegível refere-se estritamente a tratamento completo para TB Latente. Pelo seu elevado risco, estes contactos devem fazer quimioprofilaxia;
- (2) Nestas situações a requisição de teste IGRA é dispensável, sendo o resultado do teste tuberculínico suficiente para decidir sobre elegibilidade para tratamento do caso em causa;
- (3) Excepto se se tratar de uma criança não vacinada com BCG;
- (4) Nos casos em que é elegível o tratamento da ITBL, depois de despiste cuidadoso de TB em actividade, dever-se-á ponderar o risco de hepatotoxicidade e as condições de adesão ao tratamento. Não é recomendada a repetição de qualquer destes testes durante ou depois do tratamento da ITBL, a menos que se trate de outro episódio de exposição;
- (5) Conforme (Cfm) o grau de risco estimado com base no grau de exposição, a decisão deve ser individualizada;
- (6) Depois das 8 semanas ou depois do período de quimioprofilaxia para decidir continuar ou não com o objectivo de tratar a ITBL.

Tabela 2 – Algoritmo para o diagnóstico de infecção latente, e consequente ponderação de tratamento, em doentes candidatos a tratamento com anti-TNF alfa conforme a vulnerabilidade da população alvo e os resultados dos testes.

População Alvo	Tuberculina (TST)	IGRA	Tratamento	Seguimento
Pessoas imunodeprimidas candidatas a tratamento imunossupressor	Positivo (≥ 5 mm)	Qualquer resultado	Elegível	(1)
	Negativo (<5mm)	Qualquer resultado	Elegível	(1)
Pessoas não imunodeprimidas candidatas a tratamento imunossupressor	Positivo (≥ 5 mm)	Qualquer resultado	Elegível	(1)
		Positivo	Elegível	(1)
	Negativo (<5mm)	Indeterminado	Não elegível	Repete IGRA (2)
		Negativo	Não elegível	(2)

- (1) Vigilância clínica sistemática para detecção precoce de reactivação tuberculosa, durante todo o tempo do tratamento com Anti-TNF alfa;
- (2) Reforço da vigilância clínica sistemática para detecção precoce de reactivação tuberculosa e ponderação de tratamento de ITBL se se detectarem sequelas de TB ou nódulos de Gohn em pessoas que nunca tenham recebido tratamento anti-tuberculoso anterior.

Tabela 6 – Esquema de tratamento para a ITBL.

12.2. Anexo 2

Quadro 5- Esquemas de tratamento recomendado, considerando as drogas disponíveis

ESPÉCIE	FORMA CLÍNICA	DROGA/CONDUTA	DURAÇÃO
<i>M. avium</i>	Pulmonar	Clarithromicina - 500mg (2x ao dia)	+
<i>M. intracellulare</i>		Etambutol - 25mg/kg/dia	+
		Rifampicina - 600 mg	+
	Pulmonar cavitária ou disseminada	Adicionar ao esquema acima: Amicacina - 15 mg/dia (3 a 6 meses até a negatificação da cultura)	+
		Levofloxacina - 500mg/dia ou moxifloxacina - 400mg/dia	+
	Linfadenite - crianças	Exérese cirúrgica	
	Linfadenite em adultos	Exérese cirúrgica.	9-24 meses conforme
		Em caso de recidiva, nova excisão	+
		Rifampicina 600mg/dia	+
		Etambutol - 15mg/kg/dia	+
		Clarithromicina - 500mg (2x ao dia)	
<i>M. kansasii</i>	Pulmonar e extrapulmonar	Isoniazida - 300mg	+
		Rifampicina - 600mg	+
		Etambutol - 25mg/kg/dia	+
	Pulmonar cavitária ou disseminada	Acrescentar ao esquema acima: Estreptomicina (0,5 a 1g/dia) por 2 meses, a seguir 2x por semana (6 a 12 meses)	
	Linfadenite	Exérese cirúrgica	
<i>M. marinum</i>	Cutânea localizada	Etambutol - 25mg/kg/dia	+
		Rifampicina - 600 mg	ou
		Clarithromicina 500mg (2x ao dia)	ou
		Doxiciclina 100 mg (2x ao dia)	
<i>M. fortuitum</i>	Cutânea localizada	Clarithromicina 500mg (2x ao dia)	+
		Ciprofloxacina 500mg (2x ao dia)	
<i>M. fortuitum</i>	Pulmonar (raro), disseminada ou cutânea extensa	Clarithromicina 500mg (2x ao dia)	+
		Quinolona (Levofloxacina 500mg/dia ou Moxifloxacina 400mg/dia)	+
		Amicacina -15 mg/kg/dia (3 a 6 meses até a negatificação da cultura)	ou
		Imipenem - 500-750 mg (3x ao dia)	ou
		Cefoxetina 200 mg/dia	
<i>M. abscessus</i>	Pulmonar, disseminada	Clarithromicina - 500mg (2x ao dia)	+
<i>M. chelonae</i>	ou cutânea extensa	Amicacina -15 mg/	+
		Cefoxetina - 200mg/dia	ou
		Imipenem - 500-750mg (3x ao dia), dia (3 a 6 meses até negatificação da cultura)	
	Cutânea localizada	Clarithromicina 500mg (2x dia)	6 meses
	Ocular	Clarithromicina + quinolona tópica: amicacina ou ciprofloxacina ou ofloxacina	+
			6 meses
Outras espécies		Consultar o CVE-SP para indicação	

Fonte: ATS, 1997; Wagner & Young, 2004

Tabela 7 – Esquema terapêutico para as MNT.

12.3. Anexo 3

12.3.1. Método de N-Acetil-L-Cisteína Hidróxido de Sódio (NALC-NaOH)

Reagentes

Solução de NALC-NaOH MycoPrep

- Desenroscar ligeiramente a tampa do frasco de reagente MycoPrep, localizar a ampola e cuidadosamente retirar o excesso de ar;
- Enroscar a tampa e pressionar o frasco até que a ampola quebre;
- Homogeneizar suavemente para dissolver a NALC;
- Depois de ativada a solução NALC-NaOH MycoPrep deve ser utilizada num período máximo de 24h.

Tampão fosfato BBL MycoPrep (pH 6,8)

- Verter o conteúdo de uma saqueta de tampão fosfato BBL MycoPrep num balão volumétrico de 500 ml;
- Adicionar água destilada até perfazer o volume de 500ml;
- Transferir a solução tampão para um frasco com tampa de rosca;
- Etiquetar com o nome e data de preparação;
- Autoclavar a 121°C durante 20 minutos;
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente e refrigerar.

Hidróxido de Sódio (NaOH) a 4%

- Dissolver 4 g de NaOH em 100 mL de água destilada;
- Etiquetar com nome e data de preparação;
- Autoclavar a 121°C durante 20 minutos;
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente e refrigerar.

Ácido Clorídrico (0,2M)

- Adicionar lentamente 1,7 ml de ácido clorídrico a 37% (12,06 M) a 98,3 ml de água destilada;

- Etiquetar com o nome e data de preparação;
- Autoclavar a 121°C durante 20 minutos;
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente e refrigerar.

12.3.2. Método do ácido sulfúrico a 4%.

Reagentes

Ácido Sulfúrico a 4%

- Adicionar lentamente 4 mL de ácido sulfúrico concentrado a 96 mL de água destilada;
- Etiquetar com o nome e data de preparação;
- Autoclavar a 121°C durante 20 minutos;
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente e refrigerar.

Tampão fosfato BBL MycoPrep (pH 6,8)

O método de preparação já foi descrito anteriormente.

Hidróxido de Sódio (NaOH) a 4%

O método de preparação já foi descrito anteriormente.

Ácido Clorídrico (0,2M)

O método de preparação já foi descrito anteriormente.

12.3.3. Método do ácido oxálico

Reagentes

Ácido oxálico a 5%

- Dissolver 5 gr de ácido oxálico em 100 ml de água destilada;
- Etiquetar com o nome e data de preparação;
- Autoclavar a 121°C durante 20 minutos;
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente e refrigerar.

Hidróxido de Sódio (NaOH) a 4%

O método de preparação já foi descrito anteriormente.

Ácido Clorídrico (0,2M)

O método de preparação já foi descrito anteriormente.

Soro Fisiológico a 0,85%

- Dissolver 0,85 gr de cloreto de sódio (NaCl) em 100 ml de água destilada;
- Etiquetar com o nome e data de preparação;
- Autoclavar a 121°C durante 20 minutos;
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente e refrigerar.

12.4. Anexo 4

12.4.1. Coloração de Gram

Reagentes

Álcool-Acetona

- Juntar 3 litros de álcool etílico a 98% com 1 litro de acetona;
- Etiquetar com o nome e data de preparação;
- Guardar à temperatura ambiente.

Violeta de Genciana / Safranina

São utilizados os corantes já preparados (adquiridos comercialmente).

12.4.2. Coloração de ZN

Reagentes

Álcool-Ácido 3%

- Adicionar cuidadosamente 3mL de ácido clorídrico (37%) a 97mL de etanol (95%);
- Etiquetar com o nome e data de preparação;

- Guardar à temperatura ambiente durante 3 meses.

Fucsina Básica e Azul de Metileno

São utilizados os corantes já preparados (adquiridos comercialmente).

12.4.3. Coloração da Auramina

Reagentes

Preparar a solução 1:

- Num balão volumétrico de 500 ml dissolver 2gr de cloreto de magnésio em 50 ml de fenol aquoso*;
- Adicionar água destilada até perfazer 500 ml.

Preparar a solução 2:

- Dissolver 1g de Auramina em 500 ml de água destilada.

Preparar solução 1+2:

- Juntar lentamente a solução 2 à solução 1 (agitando suavemente);
- Filtrar em papel de filtro 8funil de pregas) e recolher diretamente o filtrado num frasco escuro (devido à sensibilidade do reagente à luz);
- Etiquetar com o nome e data de preparação;
- Conservar ao abrigo da luz à temperatura ambiente.

*Preparação de Fenol Aquoso

- Fundir, em banho-maria, 1 Kg de fenol cristalizado em 100 mL de água destilada;
- Deixar arrefecer;
- Etiquetar com o nome e data de preparação;
- Conservar à temperatura ambiente.

Fucsina Ácida

- Dissolver 1g de Fucsina ácida em 400 ml de água destilada;
- Adicionar lentamente 1 mL de ácido acético;

- Etiquetar com o nome e data de preparação;
- Deixar repousar 8 dias em frasco escuro antes de utilizar, ao abrigo da luz à temperatura ambiente.

Álcool-Ácido 0,5%

- Adicionar cuidadosamente 0,5ml de ácido clorídrico concentrado a 100ml de etanol a 70%;
- Etiquetar com o nome e data de preparação;
- Guardar à temperatura ambiente durante 3 meses.